Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 1/10/2012

1/10/2012

Sbobinatore: Stefano Antonelli

Patologia Generale e Fisiopatologia Clinica – prof. Berton

ARGOMENTI OGGETTO DEL CORSO DI PATOLOGIA GENERALE:

Diversi aspetti di patologia cellulare: meccanismi molecolari attraverso i quali può svilupparsi un danno in cellule di diversi tessuti e come questi danni possono ripercuotersi in una alterazione delle funzioni di un organo e successivamente dell'organismo

1. meccanismi di reazione al danno cellulare sono rappresentati dai **meccanismi di tipo infiammatorio:** sono abbastanza stereotipati ma importanti nel meccanismo di riparazione e rigenerazione dei tessuti (restitutio ad integrum) o di ricostituzione parziale (cicatrizzazione)

Tra i meccanismi di reazione al danno si devono considerare i meccanismi di reazione al danno vascolare in particolare i meccanismi dell'emostasi (riparazione del danno di vasi arteriosi e venosi)

2. trasformazione in senso neoplastico nel contesto di meccanismi molecolari di danno cellulare che coinvolgono la trasduzione del segnale

3. meccanismi molecolari di malattia

PATOLOGIA CELLULARE

"Ogni branca della scienza ha una sua unità elementare; per la fisica è l'atomo, per la chimica è la molecola. L'unità elementare per lo studio delle malattie da parte della medicina è la cellula"

(modificato da *G. Mayno* e *I. Joris*: cellule, tessuti e malattia)

Questo approccio è in parte stato ridimensionato pur rimanendo un caposaldo della medicina moderna: il danno e la patologia a livello cellulare sono alla base di moltissimi tipi di malattie

Ogni cellula è composta da diverse unità elementari rappresentate dagli organelli che ne consentono la funzione: s**pecifiche molecole localizzate in questi organelli ne regolano la funzione: una loro lesione (ereditata o acquisita) alterano la funzione degli organelli con conseguente danno, ed eventualmente morte cellulare.**

Le malattie non derivano soltanto da alterazioni di strutture molecolari che regolano la funzione di cellule (e dei loro organelli) e dei tessuti che queste compongono, ma anche da modificazioni dell'interstizio.

Lo spazio interstiziale può essere un'importante sede di patologia (**patologia interstiziale**):

1. sviluppo di edema essudatizio o essudato: l'essudato è un accumulo di cellule infiammatorie e di liquido ricco di proteine derivanti dal plasma.

Caratterizza tutta la patologia infiammatoria e anche tutti i meccanismi di difesa basati sullo sviluppo di una risposta infiammatoria.

2. sviluppo di edema trasudatizio o trasudato: il trasudato è un accumulo di acqua ed elettroliti, estremamente povero di proteine.

3. accumulo di sostanze non degradabili che per la loro struttura fisica oltre al fatto che sono riconosciute da specifici recettori della cellula del tessuto, **determinanodanni meccanici cellulari e tissutali**, anche se in modo lento.

L'accumulo di queste sostanze non degradabili (soprattutto proteine) determinano diverse forme di patologie (amiloidosi o più in generale ialinosi)

Questo meccanismo è alla base della più importante malattia degenerativa del sistema nervoso centrale: malattia di Alzheimer

4. la comunicazione tra la cellula di un determinato tessuto e l'organismo è bidirezionale: nel corso di diversi tipi di danni anche di diverse entità, le cellule danneggiate (o che presentano alterazioni nel loro normale metabolismo) possono rilasciare molecole presenti nel citosol che dall'interstizio passano nel circolo ematico e possono essere dosabili.

Questo ha permesso lo sviluppo nella medicina moderna della medicina di laboratorio: identificazione delle patologie sulla base del dosaggio nel sangue di molecole che sono rilasciate dalla cellula

EDEMA TRASUDATIZIO: accumulo di liquido composto prevalentemente di acqua ed elettroliti (soluti uguali a quelli del liquido interstiziale, concentrazione diversa)

- aumento clinicamente visibile del fluido interstiziale per aumento della pressione venosa

- a seconda delle sue cause e meccanismi, l'edema può essere localizzato o generalizzato

Non è associato a infiammazione

È dovuto all'alterazione di una serie di fattori che regolano lo scambio di liquido tra sangue e interstizio. Lo scambio avviene in una struttura vascolare specializzata (microcircolo): il tessuto acquisisce dal sangue sostanze nutritive (glucosio, amminoacidi, lipidi) importanti per il metabolismo del tessuto.

Le cellule endoteliali non permettono il passaggio di molecole di grosse dimensioni per la presenza di giunzioni serrate: permettono il passaggio di acqua, piccoli elettroliti (Na^+, Cl^-) e piccole molecole (glucosio, ossigeno, aminoacidi). Questo passaggio cambia profondamente quando è alterata la permeabilità del capillare.

Lo scambio è dovuto alle **Forze di Starling:**

1. Pressione Idrostatica: pressione in uscita;

Nel versante arterioso del capillare spinge il liquido fuori dal vaso verso l'interstizio.

È più alta che nel versante venoso perché condizionata dalla forza di contrazione cardiaca che spinge sangue nell'albero arterioso.

2. Pressione Oncotica: pressione osmotica determinata dalla presenza di proteine nel plasma.

L'unica differenza nella composizione del liquido interstiziale extravascolare e il liquido presente nei vasi (plasma) è rappresentata dalla presenza di proteine: in condizioni normali nel sangue le proteine totali sono 8 gr. per 100 ml (la metà è rappresentata dall'albumina secreta dal fegato), nel liquido interstiziale invece la quota di proteine è molto bassa.

Questo comporta il fatto che nel versante venoso del capillare in cui la pressione idrostatica è molto bassa (come in tutto il distretto venoso) la pressione oncotica è in grado di drenare liquido dall'interstizio al sistema vascolare.

È un sistema chiuso con poca perdita (di 14ml filtrati, 12ml rientrano nel distretto venoso): il liquido esce trascinandosi una serie di componenti essenziali per il metabolismo della cellula e rientra dopo aver ceduto questi costituenti alle cellule dei tessuti.

Inoltre c'è una componente aggiuntiva che varia a seconda del tessuto interessato ed è rappresentata dal drenaggio linfatico: drena una parte del liquido che è passato dal vaso all'interstizio e attraverso il sistema linfatico lo immette nuovamente nel circolo sanguigno.

Meccanismi basati sulle alterazioni nella pressione idrostatica, nella pressione oncotica e nel drenaggio linfatico provocano edema.

1. Aumento della pressione idrostatica nel distretto venosopuò essere tale da competere con la pressione oncotica che richiama liquido: a seconda dell'aumento della pressione idrostatica si può avere un azzeramento della forza che richiama liquido nel vaso o anche un'inversione (passaggio di liquido dal distretto venoso verso l'interstizio).

In queste condizioni l'unico sistema per ridurre l'accumulo di liquido nell'interstizio è il drenaggio linfatico che aumenta (maggiore è la quantità di liquido presente nell'interstizio, maggiore è la quantità di liquido che entra nei vasi linfatici e che poi viene drenata)

- **Edema trasudatizio localizzato**

es: **edema di un artodovuto ad una ostruzione nella vena che drena un determinato territorio** (**trombosi**: formazione di una massa solida all'interno di un vaso venoso)

Si ha una riduzione del drenaggio dal distretto, un accumulo di liquido e quindi un aumento della pressione idrostatica venosa che porta a edema.

es: **edema polmonare in condizioni di insufficienza del cuore sinistro**

Il sangue proveniente dal circolo polmonare non viene scaricato efficacemente dal ventricolo sin e si ha quindi un aumento della pressione idrostatica nel circolo capillare polmonare che provoca l'uscita e l'accumulo di liquido nell'interstizio polmonare e nell'alveolo (riduzione degli scambi di gas).

- **Edema trasudatizio generalizzato o sistemico (anasarca)**

es: **insufficienza del cuore destro** provoca un aumento della pressione idrostatica venosa a livello sistemico.

Tutto il sangue venoso arriva al cuore destro che se non scarica nel circolo polmonare e porta alla permanenza di liquido nel distretto venoso e quindi all'aumento della pressione idrostatica.

2. Diminuzione della pressione oncotica dovuta ad una diminuzione della quantità di proteine circolanti nel plasma.

es: **edema da fame:** ridotta nutrizione può comportare una riduzione nella capacità di sintetizzare proteine sia nei tessuti che circolanti.

es: **edema per mancata funzione di organi specifici: patologie a carico del fegato**

Il fegato sintetizza gran parte delle proteine circolanti (albumina e altre): qualsiasi tipo di insufficienza epatica, di danno epatico acuto o cronico di una certa gravità comporta una riduzione della capacità sintetica del fegato e quindi la possibile comparsa di edemi di tipo trasudatizio

3. Edema trasudatizio per ostruzione linfatica che provoca una diminuzione della quota di liquido riassorbito.

Eventi compressivi possono essere molteplici: masse neoplastiche, crescita di microrganismi nelle stazioni linfonodali che alterano il flusso.

EDEMA ESSUDATIZIO: accumulo di acqua, elettroliti, proteine e cellule per aumento di permeabilità.

Sia nel distretto venoso che arterioso del capillare si verificano una serie di eventi tipici delle risposte di tipo infiammatorio che comportano una contrazione delle cellule endoteliali e alterazioni della barriera endoteliale che permettono il passaggio di acqua e proteine che si accumulano nell’interstizio aggravando il fenomeno edematoso.

FATTORI CONDIZIONANTI L'ACCUMULO DI FLUIDI IN UN TESSUTO:

sono P= la pressione idrostatica capillare (P_c) o interstiziale (P_{if}) e π= la pressione oncotica capillare (π_{pl}) o interstiziale (π_{if})

$$(P_c - P_{if}) - (\pi_{pl} - \pi_{if})$$

- Il capillare arterioso ha valore positivo: spinge liquidi fuori dall’interstizio.

- Il capillare venoso ha valore negativo: richiama liquido dall’interstizio.

La differenza è quella drenata dai vasi linfatici

Le cellule danneggiate (o che presentano alterazioni nel loro normale metabolismo) possono rilasciare molecole che dall’interstizio passano nel circolo ematico e possono essere dosabili per identificare patologie

Particolarmente eclatante nel monitoraggio di processi necrotici (lesioni irreversibili di cellule)

Es. Cuore in seguito ad ostruzione acuta del flusso sanguigno attraverso una arteria coronaria (Infarto del miocardio: necrosi acuta del tessuto miocardico in seguito ad ischemia)

Una serie di proteine contenute nei miocardiociti sono rilasciate nel circolo sanguigno (*cfr. tabelle slide 9 e 10):

- quantità aumentate di enzimi nel plasma:

monitoraggio isoforma CK-Mb della creatinchinasi: identificazione di un evento necrotico che si realizza nel cuore

monitoraggio isoforma LDH-1 della lattico deidrogenasi: identificazione di patologie cardiache

- quantità aumentata di componenti strutturali del plasma:

monitoraggio troponine (isoforma T e I), mioglobina, catene leggere della miosina

La cinetica del rilascio e la permanenza in circolo di queste molecole e strutture è diversa: il dosaggio di queste molecole può distinguere un processo infartuale di recente sviluppo da un processo infartuale che ha già una certa durata.

APPROCCIO MOLECOLARE: lesioni (ereditate o acquisite) di specifiche molecole alterano la funzione di organelli con conseguente danno, ed eventualmente morte cellulare

Un'alterazione genetica o un insulto (danno) determinano un difetto primario in un enzima o in una proteina strutturale o in altro (alterazioni molecolari iniziali) che possono poi comportare difetti o risposte secondarie che a loro volta comportano lo sviluppo di patologia.

La patologia molecolare è caratterizzata da un approccio "riduzionistico": riduce la complessità di un organismo ad una singola molecola.

I progressi della medicina negli ultimi 50 anni sono prevalente dovuti a questo tipo di approccio: identificazione di fenomeni patologici come fenomeni dovuti a lesioni di specifiche molecole.

In realtà una funzione biologica non può essere attribuita (se non in casi eccezionali o particolari) ad una singola molecola. Un fenomeno biologico (e quindi la sua controparte patologica) derivano da una complessa interazione tra diversi costituenti delle cellule (proteine, acidi nucleici, piccole molecole).

La biologia e la patologia deve essere in grado di capire la dinamica di una complessa rete di fenomeni che deriva dall'interazione di diverse molecole.

Questo è stato razionalizzato in una nuova disciplina chiamata BIOLOGIA DEI SISTEMI che tenta di rivoluzionare la biologia attraverso un approccio sistematico che permetta di avere una visione complessiva (modello) di un sistema biologico come di un tutto.

PATOLOGIA MOLECOLARE

Un insulto (lesione genetica) originaria determina una alterazione di una molecola (patologia molecolare) che può portare ad una alterazione di un equilibrio all'interno della cellula (alterazione dell'omeostasi cellulare).

L'alterazione dell'omeostasi cellulare innesca dei meccanismi di adattamento che vanno di pari passo con alterazioni di funzione (patologia cellulare). Le alterazioni di funzione possono essere corrette o determinate da adattamenti.

Le evoluzioni di questi processi possono essere:

- **correzione delle alterazioni**.

- **sviluppo di patologie d'organo (compromissione della funzione)che possono diventare patologie di organismo** perché l'alterazione di un sistema con funzioni specifiche può determinare alterazioni ad altri distretti (una compromissione della funzione epatica determina una diminuzione delle proteine circolanti e determina edemi che a loro volta possono causare alterazioni funzionali di altri organi)

- **necrosi con danno irreversibile della cellula**: i fenomeni necrotici comportano anche una patologia d'organo in quanto la funzione dell'organo è sostenuta da un numero di cellule minore (compromissione della funzione) e anche fenomeni reattivi che a seconda del tessuto interessato possono essere rigenerativi (riformazione di un tessuto funzionante con tutte le caratteristiche del tessuto che è andato in contro a necrosi) o riparativi (fenomeni riparativi sono rappresentati dalla formazione di una cicatrice cioè di un tessuto interstiziale connettivo che non consente il recupero di funzione).

Vi sono alterazioni molecolari che non comportano conseguenze patologiche:

- **alterazione molecolare interessa regioni della molecola non implicate nella funzione:** riguarda una serie di polimorfismi genetici che non comportano necessariamente alterazioni di funzione del prodotto genico.

- **alterazione molecolare comporta alterazioni funzionali parziali (riserva funzionale):** esiste nell'organismo un eccesso sia a livello di cellule sia a livello di molecole responsabili di una serie di funzioni.

Nel caso in cui venisse alterata una parte soltanto di una molecola o venisse alterata solo una parte di una popolazione cellulare, non si avrebbero manifestazioni di malattia.

- **molecole ad azione simile vicariano le funzioni della molecola alterata (ridondanza d'azione):** nel lungo processo evolutivo che ha portato alla moltiplicazione di una serie di geni, si sono generate molecole con azione simile e che quindi vicariano la normale funzione nel caso di alterazioni molecolari.

Importante dal punto di vista sperimentale: generazione di topi ko che permettono di studiare a livello di organismo le conseguenze dell'inattivazione specifica di un gene e vedere le conseguenze sia nel corso di una stabulazione normale dell'animale (processi complessi come l'invecchiamento, la comparsa di tumori, ecc) sia in situazioni di stress (esposizione dell'animale a malattie ad esempio causate da agenti patogeni) al fine di identificare le molecole critiche.

In molti casi l'inattivazione del gene non provoca nessun fenotipo sia in condizioni di stabulazione normale sia in caso di esposizione a stress patologici: questo è dovuto al fatto che ci sono molecole prodotte da geni diversi che però hanno la stessa funzione e quindi vicariano un danno molecolare specifico.

- **solo con la contemporanea alterazione di più molecole si ha malattia (patologia multifattoriale):** le lesioni di una singola molecola è insufficiente a provocare malattia ma sono necessarie alterazioni molecolari multiple che possono derivare o da diversi stimoli (fattori esogeni che determinano un certo tipo di danno) o da lesioni di specifici geni che di per sé non comportano lo sviluppo di malattia ma comportano una maggiore predisposizione a sviluppare malattie in seguito ad esposizione a fattori ambientali (es. arteriosclerosi).

Una cellula normale in equilibrio (omeostasi), sottoposta ad uno stress o ad un danno, può andare incontro ad adattamenti o a morte (direttamente in tempi più o meno rapidi o nonostante si siano verificati una serie di adattamenti).

ADATTAMENTI A LIVELLO CELLULARE:

1- Autofagia

2- Unfolded protein response (UPR)

3- Sorveglianza dell'integrità del genoma: risposta al danno genotossico (esposizione di cellule ad agenti che provocano danno al DNA)

4- Regolazione del metabolismo

5- Modificazioni del numero di cellule: aplasia/ipoplasia/iperplasia

6- Modificazioni delle dimensioni delle cellule: atrofia/ipotrofia/ipertrofia

AUTOFAGIA

Il comparto vescicolare delle cellule è formato da reticolo endoplasmico rugoso e liscio, apparato di Golgi, apparato lisosomiale, vescicole endocitarie che possono derivare dall'esterno.

All'interno di fenomeni di traffico vescicolare si ha la formazione di **lisosomi secondari** (prodotto della fusione tra lisosomi e vescicole endocitiche di varia origine) nei quali si verifica la degradazione dei contenuti delle vescicole.

All'interno della cellula si formano vescicole a doppio strato che consentono un meccanismo di tipo autofagico: l'autofagia rappresenta una forma specializzata di endocitosi ed è caratterizzata dalla formazione di membrane a doppio strato che racchiudono citosol o organelli cellulari invecchiati (mitofagia nel caso di mitocondri) e li veicolano a lisosomi dove vengono degradati.

Meccanismi di autofagia sono implicati in importanti processi di patologia cellulare che sono alla base di malattie (es. invecchiamento)

Le doppie membrane derivano dal reticolo endoplasmico e si aprono e si richiudono a contenere una serie di organelli cellulari. Queste si fondono con i lisosomi che rilasciano idrolasi acide che degradano i costituenti racchiusi nell'autofagosoma.

Nel complesso fenomeno dell'autofagia sono state identificate specifiche molecole molecole che sono in grado di favorire una delle diverse tappe della formazione dell'autofagosoma o dell'autolisosoma.

L'alterazione di una di queste tappe porta a patologia.

Autofagia e invecchiamento: le cellule giovani hanno un efficacissimo meccanismo di autofagia che riduce i fenomeni apoptotici, riduce i fenomeni infiammatori, rimuove i mitocondri invecchiati.

Un'efficace rimozione dei mitocondri invecchiati da parte di efficaci meccanismi autofagici è alla base della capacità dell'autofagia di inibire apoptosi e infiammazione.

L'accumulo di mitocondri invecchiati induce apoptosi (attraverso il rilascio di citocromo C e di altre molecole) e induce infiammazione (attraverso l'attivazione dell'inflammosoma).

Correlazione tra autofagia e patologia: patologie degenerative del sistema nervoso centrale.

In tre principali patologie degenerative del sistema nervoso centrale (malattia di Alzheimer, malattia di Huntington, morbo di Parkinson) ci sono una serie di evidenze di una alterazione del processo autofagico.

UPR (Unfolded Protein Response)

È un processo di adattamento che origina dal reticolo endoplasmico.

Il reticolo endoplasmico:

- è una stazione importante sia dal punto di vista sintetico (sede principale di sintesi di proteine destinate a diversi distretti della cellula) sia dal punto di vista di modificazione delle proteine sintetizzate (sede di una serie di processi di glicosilazione).

- sono accumulate molecole che provengono dall'esterno (può essere modificato dall'accumulo eccessivo di lipidi in particolare di colesterolo, è bersaglio di una serie di agenti tossici come ad esempio i radicali liberi dell'ossigeno)

Nel reticolo endoplasmico c'è un sistema di salvaguardia dall'accumulo di proteine denaturate o danneggiate sia per lesioni di geni sia per difetto di funzionamento del reticolo endoplasmico. Queste proteine danneggiate sono legate da molecole con funzione di chaperoni (BiP) che determinano una correzione.

Queste molecole di controllo sono in un certo equilibrio: quando l'accumulo di proteine non propriamente foldate o danneggiate nel reticolo endoplasmico è eccessivo, vengono attivati dei sistemi molecolari che fanno parte della membrana del reticolo endoplasmico.

UPR si attiva in presenza di danni al reticolo endoplasmico e induce:

- **riduzione della sintesi proteica:** per non sovraccaricare la cellula di proteine non propriamente foldate

- **sintesi di regolatori della trascrizione di geni (fattori di trascrizione)** codificanti per una serie di proteine (chaperoni, foldasi), di enzimi che modificano (glicosidasi e mannosidasi) o degradano (proteasi) proteine, di enzimi che permettono la neosintesi di fosfolipidi per correggere i danni che si verificano nella membrana del reticolo endoplasmico.

ERAD (endoplasmatic reticulum-associated degradation): riarrangiamento e rinnovamento del reticolo endoplasmico danneggiato che cerca di correggere una determinata risposta

(Relazione con la patologia: questa risposta può essere insufficiente rispetto all'entità del danno e quindi nonostante l'attivazione di questa risposta la cellula va in contro a processi irreversibili come ad esempio l'apoptosi)

Se prolungata e eccessiva è utilizzata perinnescare una risposta di tipo infiammatorio: le stesse componenti implicate nella trascrizione di geni i cui prodotti sono specifici per riparare il reticolo endoplasmico danneggiato, sono anche in grado di innescare una risposta infiammatoria.

L'attivazione dei fattori di trascrizione NFkB e AP1 determinano la trascrizione di geni per molecole che inducono risposta infiammatoria (relazione tra infiammazione in forma prolungata e non controllata e malattia).

Questi geni pro infiammatori possono essere responsabili dello sviluppo di patologie (es. diabete di tipo 2 e arteriosclerosi).

Quando la risposta basata sul UPR non riesce a riparare efficacemente il reticolo endoplasmico danneggiato, si verifica un fenomeno caratterizzato dal **rilascio di calcio dal reticolo endoplasmico**: un eccessivo rilascio di calcio determina un eccessivo uptake di calcio da parte dei mitocondri.

Elevate concentrazioni di calcio libero che entra nei mitocondri porta alla formazione di un poro sulla membrana dei mitocondri e al rilascio di fattori che determinano l'apoptosi.

Un danno al reticolo endoplasmico può evolvere verso un fenomeno di tipo apoptotico quindi un danno irreversibile alla funzione della cellula

---

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 2/10/2012

Patologia 02/10/2012

Danno da radicali liberi dell'ossigeno

I radicali liberi dell'ossigeno sono atomi di ossigeno con un elettrone spaiato e altamente reattivi. La riduzione dell'ossigeno infatti avviene in maniera monovalente (accetta gli elettroni uno alla volta, per cui si formano specie chimiche intermedie altamente reattive). La cellula, nel corso dell'evoluzione, ha sviluppato sistemi per ovviare ai danni dei radicali, producendo enzimi o strutture dotate di tasche che catturano l'ossigeno impedendogli di reagire con altre specie chimiche quando altamente reattivo, o molecole disattivanti i radicali stessi. Nonostante i sistemi di difesa, vi è sempre una certa fuga di radicali che provocano danno cellulare (invecchiamento cellulare). Un'eccessiva produzione di radicali o un calo dei sistemi di difesa (Morbo di Parkinson) sono causa di numerose patologie. L'O²â • » (anione superossido) è il radicale principale che può dismutare in altre forme radicali o meno (Hâ,,Oâ,,/acqua ossigenata, radicale idrossile, O• caratterizzato da inversione di spin di un eâ • » esterno e quindi instabile) inducendo un processo di amplificazione (da un radicale se ne ottengono altri).

FONTI ESOGENE DI RADICALI

1)Radiazioni ionizzanti (mezzi con cui l'energia si propaga nello spazio), colpiscono le strutture cellulari cedendo energia e danneggiandole. Colpiscono l' Hâ,,O producendo OHâ • » + Hâ • º + eaq (eâ • » solvato ottenuto per radiolisi). Possono essere raggi X, α, γ ecc.

2)Luce , normalmente i fotoni non forniscono energia sufficiente per produrre danno ma se nell'organismo sono presenti *fotosensibilizzatori*, questi assorbono energia dai fotoni e la cedono alle specie chimiche circostanti variandone il senso di rotazione degli elettroni più esterni e inducendo formazione di radicali. Nelle porfirie si deposita la protoporfirina (precursore dell'eme) che funge da fotosensibilizzatore non permettendo ai pazienti di esporsi alla luce solare.

FONTI ENDOGENE DI RADICALI

1)Autossidazione come nei tioli (-SH), nelle catecolamine (catabolismo e formazione) e nelle flavine (gruppi FAV ossidabili).

2)Enzimi citoplasmatici, come la *xantina ossidasi* e alcune deidrogenasi).

3)Sistema di trasporto degli elettroni, nella catena di trasporto mitocondriale e nel sistema del citocromo p450 nel RE a funzione detossificante.

4)Enzimi dei perossisomi, ossidasi a funzione detossificante che inducono produzione di Hâ,,Oâ,, (acqua ossigenata), non radicale ma altamente reattivo e in grado di produrne.

5)Enzimi di membrana, come la *NADPH ossidasi* dei leucociti che forma appositamente radicali (O²â • ») nel vacuolo fagocitario per eliminare i microrganismi fagocitati. Quasi tutte le cellule esprimono simil NADPH ossidasi che producono piccole quantità di radicali che fungono da mediatori cellulari (*in piccole quantità i radicali fungono da mediatori chimici!*).

6)Cascata dell'acido arachidonico, si forma O²â • » per produrre endoperossidi (mediatori chimici dell'infiammazione).

7)NO sintasi, L-arginina + NADPH + Oâ,, + FAD--> citrullina + NO•, prodotta nei globuli bianchi per eliminare i microrganismi, nelle cellule endoteliali per regolare il tono vascolare (vasodilatazione e fluidificazione sangue), nei neuroni per la modulazione

sinaptica. Inoltre, reagendo con O²â • » produce perossinitrito (ONOOâ • »), un potente uccisore di batteri e funghi oppure può reagire con Hâ,,Oâ,, producendo OH• in presenza di ferro (reazione di Fenton).

E' importante saper distinguere quando la produzione dei radicali è necessaria in piccole quantità oppure quando è il risultato non voluto di reazioni chimiche che avvengono quotidianamente.

XANTINA DEIDROGENASI E OSSIDASI

(ipo)xantina + Hâ,,O + NADâ • º --> acido urico + NADH + Hâ • º , è la reazione fisiologica tramite la quale i cataboliti dell'ATP vengono espulsi tramite le urine. Viene catalizzata dalla xantina deidrogenasi che in seguito a proteolisi mediata da calpaina, induce la formazione di xantina ossidasi che catalizza una reazione differente: (ipo)xantina + Hâ,,O + Oâ,, --> acido urico + 2 O²â • » + Hâ • º , dove l'accettore di elettroni è l'ossigeno che forma l'anione superossido. La conversione della xantina deidrogenasi in xantina ossidasi avviene nei casi di ischemia (diminuzione di ossigeno in un tessuto dovuto ad ostruzione di un vaso sanguigno) quando si ha il normale ripristino del livello di ossigeno.

SISTEMA Cyt P 450

A livello del REL degli epatociti si ha smaltimento degli xeno biotici (sostanze estranee come farmaci, alcol, steroidi ecc.) che induce formazione di radicali liberi dovuta a fuga di elettroni dal ferro o dal FAD, secondo tale reazione: cyt P450 (con Fe³â • º) + RH (xeno biotico in forma ridotta) + Oâ,, --> cyt P450 (con Fe²â • º) + ROH (xeno biotico in forma ossidata) + Hâ,,O. La continua esposizione a sostanze tossiche aumenta il tasso di radicali liberi e quindi la probabilità di danno cellulare.

CATENA RESPIRATORIA MITOCONDRIALE

Si ha un flusso di elettroni a partire dal NADH fino all'ossigeno (accettore finale) tramite una catena di trasportatori dove in tre siti differenti si ha formazione di energia utilizzata per la sintesi di ATP. Se si ha fuga di elettroni si formano radicali liberi che danneggiano la struttura mitocondriale. In condizioni fisiologiche la fuga di elettroni risulterà blanda, mentre si avrà un aumento della loro perdita in tre condizioni:

- Diminuzione della velocità di flusso degli elettroni (ad esempio in caso di ipossia, carenza di ossigeno)

- Disaccoppiamento P/O, dove si ha aumento della velocità del flusso di elettroni e di consumo di ossigeno ma non produzione di ATP (viene generato solo calore). Si ha nel caso di intossicazioni da fenoli (agenti disaccoppianti) o fisiologicamente negli orsi in letargo (gli acidi grassi fungono da disaccoppianti)

- Iperossigenazione, causata ad esempio da un'erronea ossigenoterapia

NADPH OSSIDASI

Inizialmente trovato nei fagociti, serve per eliminare i microrganismi patogeni . In questo caso si ha quindi produzione volontaria dei radicali liberi. La riduzione del NADPH in NADPâ • º porta alla formazione di 2O²â • » a partire dall'ossigeno intracellulare. La produzione continua di NADPH è resa possibile dallo shunt del glucosio-6-fosfato-->6-fosfogluconatone, per cui un aumento dell'attività catalitica dell'enzima comporta un' accelerazione dello shunt. L'enzima presenta una struttura complessa costituita da diverse proteine a diverso peso in KD che in stato di riposo ("resting") presentano subunità ancorate alla membrana (p21, una G protein e gp91 che è un citocromo chelante il ferro), subunità libere (p47, p67, p40) a volte nominate col termine FOX ("ossidasi dei fagociti"), una piccola G protein Rac legata ad un GDI ("inibitore della dissociazione del GDP") e una GDP in stato resting. Quando il fagocita ingloba l'agente patogeno, il complesso si associa in seguito a fosforilazione delle componenti citoplasmatiche (ad opera di PK) che si attaccano alle subunità ancorate alla membrana e permettono il passaggio di elettroni verso l'ossigeno nel vacuolo. A questo punto l'2O²â • » + NO produce perossinitrito (ONOOâ • »), forma Hâ,,Oâ,, ad opera della superossido dismutasi, oppure OClâ • » (ipoclorito o varichina) ad opera della mieloperossidasi. Dall'acqua ossigenata si forma invece OH• secondo la reazione di Haber-Weiss o la reazione di Fenton (in presenza di ferro). Nelle emocromatosi, l'accumulo di ferro danneggia la cellula anche attraverso il processo di amplificazione dei radicali liberi.

DANNO DA RADICALI

1)Calo di ATP e di energia utilizzata per la riparazione dei danni da radicali

2)Diminuzione del GSH (glutatione in forma ridotta) che tampona i radicali e se in eccesso viene espulso dalla cellula (<[GSH] intracellulare sono un marker di danno da radicali)

3)Ossidazione gruppi –SH con formazione di ponti disolfuro e alterazione delle attività enzimatiche

4)Lipoperossidazione con rottura della membrana plasmatica e formazione di malondialdeide (marker di danno da radicali)

5)>[Naâ • º] e [Ca²â • º] intracitoplasmatiche

MECCANISMI DI DIFESA DAI RADICALI

A**)Enzimi**

- Sistema del glutatione: *glutatione perossidasi*, smaltisce l' Hâ‚‚Oâ‚‚ utilizzando il glutatione che si ossida formando Hâ‚‚O e la *glutatione reduttasi* che riduce il glutatione tramite il NADPH, andando così a costituire un ciclo che permette il continuo tamponamento dei radicali.

- Superossido dismutasi che forma Hâ‚‚Oâ‚‚ a partire da 2O²â • »

- Catalasi che da 2Hâ‚‚Oâ‚‚ forma Hâ‚‚O

- Perossidasi che ossidano substrati partendo da 2Hâ‚‚Oâ‚‚ e formando sempre Hâ‚‚O

B)Scavengers ("spazzini")

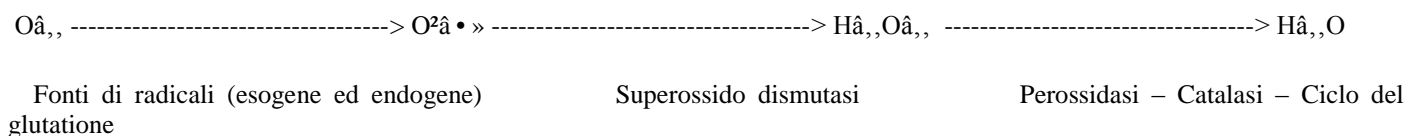
- Molecole con –SH (cisteina o glutatione privo di enzimi di supporto e quindi dotato di proprietà tamponanti intrinseche) ossidabili

- Vitamine: E, C, A (retinoidi) che intercettano gli elettroni prima che vadano a ridurre l'ossigeno

- Chelanti del Fe³â • º (ferritina, transferrina e lactoferrina) che bloccano il ferro e quindi la reazione di Fenton

Riassumendo i radicali liberi si formano e vengono smaltiti nel seguente modo:

Oâ‚‚ -----------------------------------> O²â • » ------------------------------------> Hâ‚‚Oâ‚‚ -----------------------------------> Hâ‚‚O

Fonti di radicali (esogene ed endogene) Superossido dismutasi Perossidasi – Catalasi – Ciclo del glutatione

L'aumento dei radicali o una falla a livello dei sistemi di smaltimento si traducono in un danno cellulare che coinvolge praticamente tutte le strutture esistenti della cellula (alterazione della membrana plasmatica e quindi sistemi di trasporto e segnalazione, alterazione mitocondriale e blocco del metabolismo cellulare, alterazione delle proteine citoplasmatiche con formazione di granuli di degenerazione, alterazione del RE e dei sistemi di detossificazione, rottura dei lisosomi, alterazioni del nucleo ecc.). Ciò perché il radicale di per se può reagire con qualsiasi specie chimica a se circostante. Una volta che la cellula si è irrimediabilmente alterata, questa perde le sue funzioni e va incontro a necrosi o apoptosi.

Un tempo si pensava che i radicali giocassero un ruolo solo negativo nell'economia delle diverse funzionalità cellulari. Oggi invece si è scoperto che piccole quantità di radicali (facilmente tamponabili) regolano diverse funzioni cellulari, tra cui la replicazione (perché attivano l'espressione di geni coinvolti nell' espressione delle citochine in seguito ad ossidazione di IκB e

attivano le protein chinasi legate a recettori di fattori di crescita), l'attivazione di enzimi, la regolazione del tono vascolare, la sintesi del collageno (sclerodermia), la trasmissione nervosa ecc.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 3/10/2012

Giorgia Be

Prof. Berton

Lezione di patologia del 03102012

ADATTAMENTI CELLULARI

Vi sono alcuni adattamenti "classici" a livello cellulare, e di conseguenza a livello dei tessuti, relativi all'aumento di volume e di numero delle cellule che compongono questi ultimi. Definiamo **IPERTROFIA** un tipo di alterazione dovuta all'aumento di volume di un organo causata dall'aumento a sua volta del volume delle sue cellule; definiamo invece **IPOTROFIE** un gruppo di alterazioni che prevedono la diminuzione del volume delle singole cellule che compongono un tessuto.

Per quanto riguarda invece le alterazioni riguardanti non il volume bensì il numero di cellule componenti un tessuto, definiamo **IPERPLASIA**un aumento del volume di un organo in seguito ad aumento del numero di cellule che lo compongono, mentre le ***APLASIE*** *(*forma più estrema*) e le* ***IPOPLASIE***sono la diminuzione del volume di un organo in seguito a diminuzione del numero di cellule che lo compongono.

Diverse sono le cause che possono portare a queste alterazioni, considerando ipertrofia e iperplasia la prima di queste cause è un'aumentata richiesta funzionale che coinvolge il muscolo cardiaco e scheletrico a seguito dell'aumentata espressione e trascrizione dei geni preposti alla codifica delle proteine strutturali del muscolo tramite le diverse vie di trasduzione del segnale già studiate,particolarmente importanti nello studio di un gruppo di patologie cardiache per cui il volume del cuore risulta aumentato; stimolazione ormonale, responsabili di aumento di volume e numero cellulare spesso combinati fra loro in seguito alla stimolazione da parte di questi ormoni del ciclo cellulare; aumentata nutrizione, che si traduce in un aumento del tessuto adiposo e di un conseguente accumulo di nutrienti sotto forma di trigliceridi in un tessuto specializzato (vedremo l'importante ruolo dell'ipertrofia a livello del tessuto adiposo in riferimento al diabete di tipo 2); stimolazione difese biologiche, che prevedono fenomeni ipertrofici e iperplasici combinati a livello degli organi linfoidi, ad esempio i linfonodi e la milza.

DIAPOSITIVA 4. Apriamo una breve parentesi sulla presenza in alcune situazioni di un aumento di volume cellulare che non dipende tanto da una forma di adattamento della cellula in risposta a una serie di fattori esterni (es. ormonali), bensì dall'accumulo di sostanze all'interno della cellula, ad esempio dall'accumulo di **trigliceridi** all'interno di cellule facenti parte di tessuti non preposti al loro deposito, come le cellule linfocitarie, o **a livello epatico**, dove prende il nome di **steatosi**. Questo anomalo tipo di accumulo coinvolge dal punto di vista patologico non solo la cellula, ma una serie di meccanismi a cascata che poi portano alla manifestazione di queste patologie.

Un'altra situazione che ci riporta alla lezione precedente sono le alterazioni che coinvolgono i geni che codificano per proteine sintetizzate nel reticolo endoplasmatico che comportano un'alterazione nell'indirizzo di tali proteine ad un proprio distretto

specifico per cui esse si possono accumulare nel reticolo endoplasmatico e innescare così una cascata di eventi reattivi di adattamento come la **unfolding protein response** che a lungo andare possono provocare un vero e proprio danno nella cellula.

Un altro gruppo importante di accumuli è rappresentato dal complesso di patologie dovute **all'accumulo nel compartimento lisosomiale** di materiale estraneo o invecchiato. Si tratta di patologie individuali molto rare e perlopiù ereditabili ma con incidenza tuttavia non trascurabile, dovute sostanzialmente alla mutazione di geni codificanti per enzimi o geni regolatori di enzimi legati alla strutturazione del compartimento lisosomiale, che così non funziona correttamente e funge da deposito di costituenti cellulari invecchiati. Possiamo paragonare questo gruppo di patologie a una sorta di blocco selettivo di processi autofagici, nel senso che i fenomeni patologici scaturiscono dal mancato smaltimento di materiali attraverso questi compartimenti. Le cosiddette malattie da accumulo lisosomiale provocano un' abnorme ipertrofia cellulare, alla quale risulta particolarmente sensibile il sistema nervoso.

L'ultima cosa da segnalare è la presenza di un gruppo di patologie dovute all'accumulo all'interno delle vescicole endocitotiche di materiale estraneo, che se non degradato si accumula nel reparto cellulare endocitotico anche in seguito alla fusione di quest'ultimo con i lisosomi con la formazione di un lisosoma secondario e risulta tossico per la cellula. Un esempio di tale patologia è la pneumogoniosi, una malattia "professionale" oggi sempre meno presente riscontrabile su soggetti che lavorano in ambienti, come fabbriche del marmo o miniere, in cui siano presenti varie polveri fra cui quelle di silicio e asbesto, la quale viene internalizzata dai soggetti a livello degli alveoli polmonari. Qui la polvere, non degradabile, viene inglobata dai macrofagi presenti in tale tessuto che però vanno incontro ad apoptosi e alla loro morte rilasciano nuovamente le particelle che stimolano un processo di infiammazione cronica polmonare.

Al contrario abbiamo un gruppo di cause di ipotrofia e atrofia, che spesso sono accoppiate,come <u>ridotta funzione del muscolo scheletrico</u>, chiamata ipotrofia muscolare,e tutta una seria di deficienze quali<u>ridotto apporto calorico</u> e di nutrienti, <u>ridotta stimolazione ormonale</u>, <u>ridotta irrorazione o apporto di ossigeno</u>, <u>ridotta innervazione</u> o <u>fenomeni di compressione</u>, <u>malattie febbrili o autoimmunitarie</u> prolungate nonché <u>tumori</u> che portino a uno stato di cachessia, tutti fattori questi che portano a una ridotta sintesi di proteine strutturali e alterazioni tipiche di ipoplasia e ipotrofia. La cellula che ha subito un insulto dall'esterno può andare incontro a fenomeni di adattamento come visto, ma ciò può non essere sufficiente per ristabilire la sua stessa omeostasi, quindi va incontro a fenomeni apoptotici.

La morte cellulare è stata a lungo vista come un processo unico e ben definito, ad oggi invece sono state analizzate almeno quattro forme di morte cellulare, almeno due delle quali già studiate: apoptosi, necrosi, piroptosi, una forma di necrosi, e nettosi, un fenomeno cellulare piuttosto specifico. DIAPOSITIVA 6.

1- NECROSI (diapositiva 7,8,9)

Il fenomeno necrotico cellulare comporta una serie di cambiamenti nella cellula : si accompagna a grosse alterazioni della permeabilità della membrana, a cui segue sostanzialmente l'entrata di acqua nell'ambiente intracellulare, nonché a macrocambiamenti morfologici che sono stati osservati da alcuni anatomopatologi già parecchio tempo fa, fra cui per esempio si era osservato il tipico rigonfiamento degli organelli intracellulari a seguito dell'entrata dell'acqua nel citosol e negli stessi organelli, alterazioni nella struttura della cromatina e rigonfiamento dei mitocondri. Questo processo è progressivo e procede fino alla lisi della cellula e al rilascio all'esterno di tutti i suoi componenti.

La necrosi è caratterizzata appunto dal rilascio di queste componenti citoplasmatiche e nucleari nell'ambiente extracellulare: questo fenomeno è anche responsabile dell'infiammazione che da sempre caratterizza questo tipo di morte cellulare, e il concetto di correlazione fra i due fenomeni è andando approfondendosi nel corso degli anni. L' infiammazione è dovuta nello specifico al rilascio di molecole dette **DAMS**, cioè ***Damage Associated Molecular Patterns***, pattern molecolari che sono stati recentemente raccolti in una lista e che vengono riconosciuti da specifici recettori presenti sulle cellule infiammatorie. L'interazione fra recettori e DAMPS innesca il meccanismo stereotipato ma fondamentale di rigenerazione e riparazione che costituisce il processo infiammatorio. Questa terminologia proviene da studi immunologici sui PAMPS, (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) che sono molecole presenti sulla superficie di microrganismi come virus batteri e lieviti, non sulle nostre cellule, in grado di scatenare una risposta immunitaria dell'ospite contro questi organismi. Le cellule responsabili dell'infiammazione sono in grado di rispondere a due tipi di stimoli: uno esterno dato dai patogeni e uno interno dato dal danno cellulare. Alcuni studi hanno identificato alcune di queste DAMPS, fra cui sono annoverate le <u>heat shock proteins</u> presenti a livello citosolico e la cui sintesi è incrementata in condizioni di stress cellulare; le proteine <u>HMG *(High Mobility Group)*</u>, che sono associate agli acidi nucleici e rilasciabili nel corso degli anni; gli <u>istoni</u>, che essendo sempre associati agli acidi nucleici fungono da sensore per lo stato cellulare; e una proteina analizzata in un recente articolo apparso su Science detta <u>actina</u>, proteina strutturale del citoscheletro presente in tutte le cellule che viene rilasciata all'esterno nel caso in cui venga alterata la funzionalità della barriera della membrana plasmatica e che quindi può agire come DAMPS. Ci sono altri DAMPS ancora in via di identificazione.

Quali sono le sequenze progressive della necrosi? Si tratta di una sequenza temporale difficilmente schematizzabile e piuttosto lunga, le cui tappe fondamentali sono in primis la <u>diminuzione di ATP</u> intracellulare associata a <u>danno mitocondriale</u> e al rilascio da parte di questi organelli di alcuni fattori detti <u>citocromi</u>; la diminuzione di ATP ha ripercussioni importanti in termini di danno alla membrana plasmatica, che ha sulla superficie un gran numero di proteine di trasporto ATP-dipendenti (che cioè per svolgere la loro funzione idrolizzano ATP) necessarie al mantenimento di una distribuzione degli elettroliti che viene completamente stravolta nel meccanismo necrotico. I lisosomi danneggiati rilasciano delle <u>proteasi</u>, enzimi idrolitici in grado di aumentare progressivamente il danno, dopodiché notiamo un <u>rialzo della concentrazione di calcio intracellulare proveniente dal reticolo</u>

endoplasmatico. Il calcio gioca un ruolo importante nel processo in quanto è attivatore di molte delle proteasi sopra citate che amplificano gli effetti dannosi sulla cellula. In ultimo, la necrosi aumenta la produzione di specie reattive dell'ossigeno che amplificano il processo. La temporaneità del processo dipende dalle condizioni in cui versa la cellula e dal tipo di studio che si sta conducendo, ma in genere si distingue una *fase reversibile* e una *irreversibile* caratterizzata ciascuna da una diversa durata e da specifiche modificazioni chimiche: per esempio, in uno studio su cardiociti che simula un'occlusione completa di una coronaria del cuore, se usiamo un ridotto apporto di ossigeno come fattore inducente la necrosi, dopo circa venti minuti di "resistenza" le cellule andranno in necrosi. Questa tempistica è evidentemente fondamentale per quanto riguarda gli infarti, e accumuna il tessuto cardiaco al nervoso, ugualmente importante e sensibile alle riduzioni di ossigeno.

Se priviamo completamente del flusso sanguigno e quindi dell'ossigeno il tessuto nervoso, entro dieci minuti questo subirà necrosi irreversibile, mentre un'interruzione parziale può non comportare danni così drastici, anche per tempi più lunghi, rendendo così difficile distinguere il confine tra necrosi e altri meccanismi di morte cellulare. In particolare nel tessuto cerebrale si è osservato che esiste una zona limitrofa a quella con mancato afflusso di sangue, che viene chiamata *penombra ischemica*, in cui i danni che si sviluppano sono dovuti ad altri meccanismi, chimici, di tipo apoptotico, eccito-tossici o infiammatorii: questi ultimi in particolare coinvolgono l'endotelio dei vasi danneggiati e ciò comporta il richiamo in questa sede di alcune cellule dell'immunità innata come i neutrofili che rilasciano molecole responsabili appunto dell'infiammazione. Tutto ciò sottolinea la difficile distinzione netta fra i diversi tipi di morte cellulare.

2- APOPTOSI (diapositiva 10)

Il secondo tipo di morte cellulare da voi ben conosciuto è l'apoptosi, un processo chiamato anche "morte cellulare programmata" che si verifica in maniera massiccia nei tessuti ad elevato turnover cellulare, cioè tessuti in cui le cellule sono ciclicamente sostituite in tempi brevi da cellule nuove. Questo processo non comporta la rottura della cellula come nella necrosi, bensì la frammentazione della stessa in corpi delimitati da membrana. Ciò che viene impedito nel processo apoptotico è il rilascio delle componenti cellulare e dei DAMPS che invece caratterizza la necrosi: è stata definita "morte silente" in quanto è molto meno associata, rispetto alla necrosi, ad un processo infiammatorio, e questo è in gran parte dovuto alla mancata distruzione della membrana plasmatica che delimita organelli e citosol e alla mancata fuoriuscita di questi ultimi dalla cellule verso l'esterno.

Un altro aspetto caratterizzante l'apoptosi è che cellule delle difese innate (macrofagi) in grado di internalizzare componenti cellulari possono rimuovere i corpuscoli e i frammenti della cellula che ha subito apoptosi. C'è un capitolo molto ampio sui recettori in grado di riconoscere componenti presenti sui corpi apoptotici.

Importante a questo proposito è il processo di emocateresi, cioè il processo di distruzione programmata di globuli rossi invecchiati (dopo circa tre o quattro mesi di vita) che avviene a livello dei macrofagi localizzati nella milza e nel fegato e caratterizzato dal fatto che il globulo rosso invecchiato presenta delle caratteristiche sulla sua membrana esterna che lo rendono riconoscibile da parte dei macrofagi preposti al suo "inglobamento". Le cellule delle difese innate in particolare hanno particolari recettori per il riconoscimento della fosfotidilserina della membrana del globulo rosso.

3- PIROPTOSI (diapositiva 11,12,13)

Un terzo tipo di morte di morte cellulare recentemente scoperto è la piroptosi, che verrà trattato più approfonditamente più avanti, è stato identificato in un primo momento nelle cellule delle difese innate quali i neutrofili e successivamente riconosciuto nelle cellule delle mucose maggiormente a contatto con un ambiente esterno specifico, ad esempio la mucosa respiratoria. Caratteristica principale del processo è che questo tipo di necrosi è preceduta dall'attivazione di un complesso multi proteico intracellulare, cioè l'inflammosoma, che favorisce il rilascio dell'IL-1β e di altre citochine pro-infiammatorie.

L'inflammosoma può essere stimolato da più meccanismi, il primo identificato è basato sul riconoscimento di agenti patogeni e di particelle non degradabili. Esso comporta l'attivazione dell'inflammosoma in cellule delle difese innate nel contesto di una fisiologica reazione immunitaria. La stimolazione può anche essere mediata dall'interazione fra recettori di membrana sulle mucose che riconoscono un ampio spettro di agenti patogeni.

Questa piroptosi da un certo punto di vista è un "approfondimento" della necrosi in quanto mette in relazione la morte cellulare con il processo infiammatorio indotto: la cellule infatti, prima di morire, rilascia una serie di molecole che orchestrano la reazione di flogosi.

Rivedrete l'inflammosoma in maggior dettaglio successivamente. Guardando alla slide, l'inflammosoma è costituito da tre gruppi di proteine che interagiscono fra di loro, fra cui: DAMP, toll-like receptors e alcune caspasi che hanno anche un ruolo più noto nel processo apoptotico. Questa interazione spesso è paragonabile a un LEGO in cui si incastrano vari "pezzettini" delle proteine, per cui domini simili di classi diverse interagiscono al fine di ottenere uno complesso attivo.

Un ruolo importante nell'ambito di tale complesso è l'attivazione della caspasi 1 che gioca un ruolo fondamentale nella tappa finale dell'inflammosoma, cioè la creazione dell'infiammazione. Viene inoltre stimolata la produzione e il rilascio dell'IL-18 e dell'IL-1β, che viene prodotta sotto forma di precursore intracellulare che verrà clivato e quindi reso attiva dalla caspasi 1.

Vedete qui in elenco delle moltissime molecole in grado di attivare un inflammosoma: ciò appare logico nel contesto del ruolo fisiologico delle difese del nostro organismo, che sono in grado di riconoscere una numerosa serie di potenziali patogeni, quali batteri, miceti e virus, nonché materiali cosiddetti sterili potenzialmente pericolosi per l'organismo e che di solito provengono dall'ambiente esterno. Esempi di questo materiale inerte particolato sono l'asbesto, silice, amiloide e cristalli di urato. Negli ultimi anni è sorto un grande interesse attorno a questi materiali, in quanto erano erroneamente considerati non biologicamente attivi: il loro ruolo nell'attivazione dell'inflammosoma ha chiarito anche alcuni aspetti di alcune patologie, quali il diabete di tipo 2.

Vi ho riassunto qualche altro dettaglio relativo ai meccanismi diversi di attivazione dell'inflammosoma, per esempio l'amiloide, che è implicata nelle patologie neurodegenerative che interessano il sistema nervoso e che sono preceduti da una fase infiammatoria. Potete notare l'asbesto e le altre molecole che possono inoltre stimolare la produzione dei ROS, e l'attivazione di questi ultimi è una via molto importante di attivazione dell'inflammosoma.

Vi sono altri meccanismi, per esempio le radiazioni che stimolano direttamente la produzione dei ROS attivando indirettamente l'inflammosoma, e infine un'ulteriore via è rappresentata da sostanze di origine esogena (come alcune tossine batteriche) ed endogena (come cristalli di colesterolo) che non essendo facilmente degradabili tendono a danneggiare la membrana lisosomiale con la possibilità di fuoriuscita degli enzimi lisosomiali liberi nel citosol, situazione che stimola l'inflammosoma.

Importante attivatore dell'inflammosoma, emerso negli ultimi anni e che si ricollega a quanto detto nella lezione precedente, è il mitocondrio. Se danneggiati o iperstimolati come avviene nelle condizioni di iperglicemia, in particolare nel diabete, in cui le cellule si trovano a gestire un carico sproporzionato di glucosio perché mal regolate dall'insulina, i mitocondri possono attivare l'inflammosoma e questa capacità, ritenuta indiretta e dovuta all'incremento della produzione di ROS da parte dei mitocondri, è risultata recentemente essere anche diretta, in quanto il genoma mitocondriale stimola direttamente questo complesso multi proteico.

Facendo un passo indietro, questa questione ci riporta all'argomento dell'autofagia, in una sua versione specializzata chiamata ***mitofagia***. La mitofagia è la delimitazione in membrana seguita dalla distruzione di mitocondri danneggiati e costituisce un importante meccanismo di opposizione all'attivazione dell'inflammosoma, in quanto non permette ai mitocondri danneggiati di rilasciare nel citosol DNA mitocondriale che andrebbe a stimolare l'inflammosoma mediante la produzione di ROS.

Il danno mitocondriale è anche collegato a una serie di patologie autoimmunitarie infiammatorie e ai fenomeni di invecchiamento: un grosso capitolo della patologia è dedicato a questo argomento.

4- NETTOSI (diapositiva da 14 a 17)

L'ultima forma di morte cellulare interessa le cellule dell'immunità innata come eosinofili, neutrofili e granulociti, in cui è stata osservata per la prima volta, ed è chiamata nettosi.

La terminologia "nettosi" deriva dalla capacità dei neutrofili di creare delle NET (*Neutrophil Extracellular Traps*) che sono una sorta di maglie insolubili e viscose di DNA estruse dalla cellula, a cui si legano una serie di enzimi contenuti nei granuli cellulari (nell'immagine sono i pallini blu). Questo è uno dei meccanismi di cattura degli agenti patogeni da parte dei neutrofili, ed è stato dimostrato in diversi studi sperimentali: i neutrofili operano il *trapping*, cioè di fatto l'intrappolamento di agenti potenzialmente pericolosi per la cellula in un ambiente separato (la "rete") dove non possano nuocere.

Non affrontiamo la questione relativa alla legittimità di annoverare la nettosi fra i tipi di morte cellulare, anche se la cellula per creare la NET non ha distrutto la sua membrana, estrudendo da sé tutto il suo DNA di fatto non può più fare nulla.

Da sottolineare il fatto che è emerso recentemente che la formazione di NET non avviene soltanto in risposta ad agenti patogeni a livello fisiologico, ma anche in contesti che possiamo riassumere nell'ambito di patologie autoimmunitarie: questo meccanismo agisce amplificando il danno contro il self.

Ad esempio, l'interazione di piastrine o trombogeni con neutrofili, in presenza di PAMPs come tossine batteriche, può favorire la formazione di NETs e lo sviluppo di patologie immunitarie sistemiche come la sepsi.

Questo capitolo si sta espandendo con nuove ricerche e la formazione di NET può essere usata per individuare nuovi bersagli terapeutici anche per quanto riguarda alcune patologie polmonari come la fibrosi cistica.

L'immagine a microscopio a scansione immortala i neutrofili nel momento dell'estrusione di materiale nucleare, cioè di DNA che forma le NETs e intrappola i microorganismi favorendone l'eliminazione.

RIPARAZIONE E RIGENERAZIONE

Il tessuto a necrosi avvenuta può essere rigenerato, e quando parliamo di rigenerazione ci riferiamo ad un processo piuttosto complesso che comprende la sostituzione delle cellule andate perdute con nuove cellule dello stesso tipo, che conservano quindi

funzioni selettive specifiche e che consentono la "*restituito ad integrum*" della componente cellulare del tessuto. Questo processo rigenerativo passa attraverso diverse tappe, una delle più importanti risulta essere l'induzione di un processo infiammatorio iniziale che porta al richiamo di cellule delle difese innate e al rilascio da parte di queste ultime di diversi fattori di crescita che inducono la proliferazione di tipi cellulari differenti.

L'altra evoluzione possibile di un processo necrotico, in un tessuto che non può essere ricostituito perfettamente, è la riparazione del tessuto attraverso la formazione di una **cicatrice** in soluzione di continuità con il tessuto leso.

La formazione di una cicatrice è uno dei meccanismi con i quali la "reazione al danno", innescata dalla necrosi, causa patologia. Questo avviene per essenzialmente due motivi. Uno è rappresentato dal fatto che la cicatrice sostituisce un tessuto con funzioni specifiche, riducendo queste funzioni in quanto non in grado di riprodurle con la stessa specificità. L'altro, più complesso, è invece dovuto al fatto che la formazione della cicatrice può alterare il connettivo del tessuto riparato; in alcuni parenchimi una cicatrice risulta particolarmente problematica in quanto cambia il reticolo vascolare dell'organo in questione: un esempio lampante di questa difficoltà è il tessuto epatico cirrotico, che può presentare un edema tipico (*ascite*) costituito da accumulo di liquido nella cavità peritoneale che stravolge il sistema di irrorazione dell'organo dovuto appunto alla presenza di tessuto fibroso cicatriziale.

La cirrosi è un altro esempio di malattia innescata dalla formazione di cicatrice, e può portare anche a un fenomeno chiamato ipertensione portale collegato alla presenza di tessuto fibroso in questa sede.

Anche il polmone è sensibile a questo tipo di riparazione, soprattutto i vasi alveolari che si trovano a ridosso della parete di scambio sangue-gas che, in presenza di importanti estensioni di tessuto fibroso, con aumento dello spessore della parete, risultano compromessi nella loro funzione. La fibrosi in genere altera profondamente la struttura del parenchima dell'organo in questione e la sua vascolarizzazione.

CLASSIFICAZIONE DI BIZZOZZERO

Cosa distingue riparazione e rigenerazione? La differenza fra un tessuto in grado di rigenerare e uno che può solo essere riparato è stata razionalizzata da Bizzozzero che definì i tessuti in base alla loro capacità rigenerativa e distinse le cellule in perenni, stabili e labili in base alla loro velocità di turnover. La capacità rigenerativa, cioè il poter riformare un tessuto ugualmente funzionale a quello distrutto,è minima per le cellule perenni e cresce fino alle cellule labili.

Questa definizione è complicata dalla presenza delle cellule staminali, per cui la definizione risulta ad oggi imprecisa.

Le cellule perenni sono prive di attività mitotica, e non possono essere rigenerate; l'esempio primario di questo gruppo sono i neuroni, le cellule muscolari cardiache e in linea di massima gli adipociti adulti.

Le cellule stabili hanno basso indice mitotico; all'interno di un tessuto quelle che vanno in mitosi rappresentano una percentuale molto piccola, tuttavia rispondono a una seria di stimoli e la loro capacità rigenerativa è data dalla concentrazione e dalla natura di questi stimoli. Esempi di tali cellule sono gli epatociti e il tessuto muscolare scheletrico, nonché le cellule di origine mesenchimale.

Fra le cellule labili infine sono annoverate le emopoietiche e i loro precursori: esse sono dotate di potenziale differenziativo alto, caratteristica comune anche a molte cellule epiteliali di cute e mucose. Queste ultime hanno un alto turnover in quanto il loro contatto con l'esterno le pone in condizioni di stress ambientale tale da dover essere ricambiate spesso.

Notiamo una relazione di proporzionalità inversa fra "restituito ad integrum" e componente connettivale del tessuto, in pratica più connettivo c'è meno capace sarà un tessuto di rigenerarsi. Il connettivale infatti tende a ripararsi ma non a rigenerare.

CELLULE STAMINALI

Le staminali hanno nell'ultimo decennio complicato questa classificazione, in quanto presenti in molti tessuti e dotate di un potenziale differenziativo e proliferativo molto alti, sono cioè in grado di differenziare in diversi tipi cellulari e di farlo ad una velocità elevata.

Come vediamo nello schema le staminali integrano la definizione di Bizzozzero, svelando la presenza di tali cellule anche in tessuti che si pensava essere composti solo da cellule perenni, per esempio il nervoso.

Le staminali si auto-mantengono e differenziano in diversi tipi cellulari, e sono per questo oggetto di numerosissimi studi; in particolare, l'auto mantenimento è una caratteristica che ha destato molto interesse per comprendere meglio il meccanismo dell'aging cellulare (invecchiamento), sempre accompagnato da una diminuita capacità di rigenerarsi.

Queste cellule sono numerose nel midollo osseo, in cui esistono almeno due popolazioni di cellule staminali, le HSC (hematopoietic stem cell) fonte primaria delle cellule circolanti nel sangue nella vita adulta, e le MSC (Mesenchimal Stem Cells), più recentemente scoperte, che non danno origine a cellule ematopoietiche circolanti, ma sembrano che svolgere meccanismi di regolazione di cellule non differenziate.

Alcune staminali, se coltivate in vitro in condizioni particolari, possono essere indotte a differenziare verso una precisa linea cellulare: questo ha aperto le prospettive della cosiddetta "medicina rigenerativa". Numerosi sono gli esempi applicativi e i problemi etici e pratici (le cellule più plastiche e utili in tal senso sono le ES di origine embrionale). In particolare gli studi di Yamanaka hanno portato alla creazione delle iPSC, le Induced Pluripotent Stem Cells, cioè cellule somatiche differenziate che sottoposte ad una serie di stimoli in laboratorio sono state fatte tornare allo stadio di de-differenziazione staminale di alto potenziale proliferativo e differenziativo. Questa è attualmente considerata la strada maestra su cui far vertere i prossimi studi in questo campo.

I maggiori problemi legati a questo approccio è che per direzionare in un senso le iPSC bisogna immettere nelle cellule differenziate una serie di geni che ne silenzino i caratteri di differenziazione attraverso vettori retrovirali che, pur essendo efficienti, si inseriscono casualmente nel genoma, con tutte le problematiche connesse, e possono inoltre portare anche geni virali potenzialmente pericolosi. Tumori, instabilità cellulare e difficoltà di controllo sono i maggiori ostacoli anche alla "gene therapy" proposta in questi anni sfruttando le staminali.

Inoltre, i tentativi di induzione fatti in questo senso hanno per ora sempre richiesto l'introduzione nelle cellule del gene oncogeno *myc*, che oltre a regolare il ciclo cellulare è coinvolto, se mutato, nella tumorigenesi.

Le molte aspettative riguardo queste cellule saranno attese quando si potranno usare vettori totalmente sicuri e si sarà in grado di controllare perfettamente questo tipo di cellule: lo stesso discorso vale per la terapia genica.

CAUSE DI MALATTIA

Alcune caratteristiche delle cause di malattia

1- Essere *primarie, determinanti e sufficienti*

L'alterazione di una molecola porta direttamente allo sviluppo della malattia. Particolarmente istruttivi sono le mutazioni dei geni delle globine: per esempio l'anemia falciforme, dovuta ad una mutazione (valina -> acido glutammico). Si passa da una lesione discreta, ad una patologia molto complessa; le alterazioni del globulo rosso sono molteplici, tra cui ridistribuzione di fosfatidilserina sulla faccia esterna della membrana plasmatica, alterazioni di scorrimento di queste cellule nel circolo capillare a causa della loro forma alterata, determinando un processo emostatico – coagulativo con formazione di trombi, a cui seguono fenomeni infartuali.

2- Essere *coadiuvanti o predisponenti o promuoventi*

3- Essere *scatenanti*

4- Agire assieme ad altre per determinare patologia (Patologia multifattoriale)

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 8/10/2012

---

1. ESSERE PRIMARIE, DETERMINANTI E SUFFICIENTI

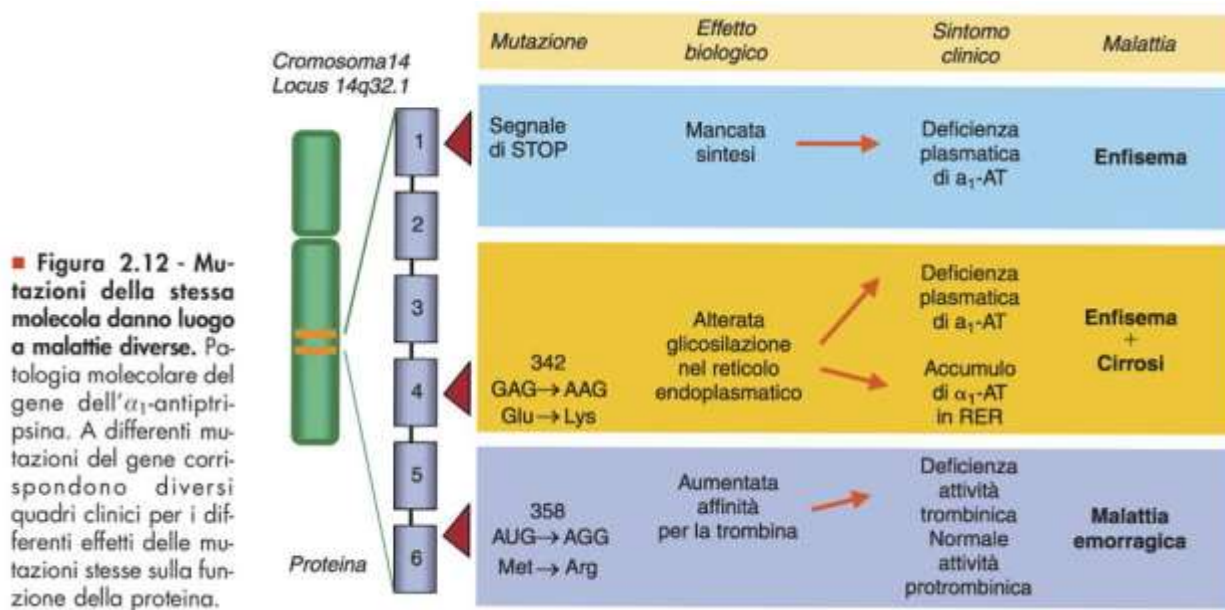
Un esempio di patologie che hanno in sé questo aspetto sono le variazioni genetiche ex novo, casuali ma sufficienti – in assenza di seconde mutazioni- a scatenare patologie fra cui fibrosi cistica e anemia falciforme *(vedi slides).*

Diversi tipi di danno inducono poi fibrosi polmonare: un esempio di questa condizione patologica è l'ispessimento della parete bronchiale con enfisema in seguito a fibrosi, quadro tipico della deficienza di alfa1-antitripsina contenuta nei liquidi biologici e nel plasma.

I neutrofili sono fra i principali responsabili data la loro vita breve; escono dai vasi e migrano nei tessuti : una sede importante è l' intestino, ma il polmone è una delle sedi in cui i neutrofili escono dai capillari alveolari e permangono nell'interstizio. Qui vanno incontro a fenomeni apoptotici e sono rimossi da macrofagi presenti in sito, ma parte degli enzimi litici (di cui i neutrofili sono ricchissimi) permane negli alveoli e la prolungata permanenza di tali enzimi proteolitici nel parenchima polmonare innesca una serie di danni e amplifica il processo infiammatorio per cui progressivamente si ha un processo tipico della malattia polmonare conosciuta come broncopneumopatia cronica ostruttiva che però, a differenza della manifestazione classica, non si sviluppa in età avanzata.

Le conseguenze patologiche della deficienza di tale inibitore della proteasi dipendono dalla mutazione del gene stesso codificante per l'inibizione.

(allego la tabella che il professore ha semplicemente letto e aggiungerò solo poche note)

Figura 2.12 - Mutazioni della stessa molecola danno luogo a malattie diverse. Patologia molecolare del gene dell'α_1-antiptripsina. A differenti mutazioni del gene corrispondono diversi quadri clinici per i differenti effetti delle mutazioni stesse sulla funzione della proteina.

Primo caso: mutazione del gene codificante per l' inibitore causa una classica situazione di mancata sintesi dovuta a segnale di stop, mancata sintesi dell'enzima, quindi deficit plasmatico dell' enzima di alfa 1 – antitripsina nei liquidi plasmatici con conseguente enfisema.

Secondo caso: mutazioni puntiformi determinano l' alterata glicosilazione della proteina nel reticolo endoplasmico. La proteina viene sintetizzata a livello epatico e le conseguenze sono in questo caso più complesse: l'alterata glicosilazione altera il pathway secretorio, quindi l'inibitore non sarà secreto e oltre alla conseguenza primaria(cioè l' enfisema) si ha un processo di stress del reticolo a causa dell' accumulo, il che innesca svariate conseguenze patogenetiche per l'epatocita fra cui infiammazione e l'evolvere di una situazione cirrotica.

Terzo caso: gain of function, in quanto la mutazione puntiforme determina l' aumento di affinità nei confronti di uno dei substrati dell' antitripsina, un enzima circolante che deriva dall' attivazione della cascata coagulativa della trombina. Questa aumentata capacità di legame e quindi la possibilità di inibire più efficacemente la trombina porta a patologia emorragica(*che sarà trattata più avanti)* .

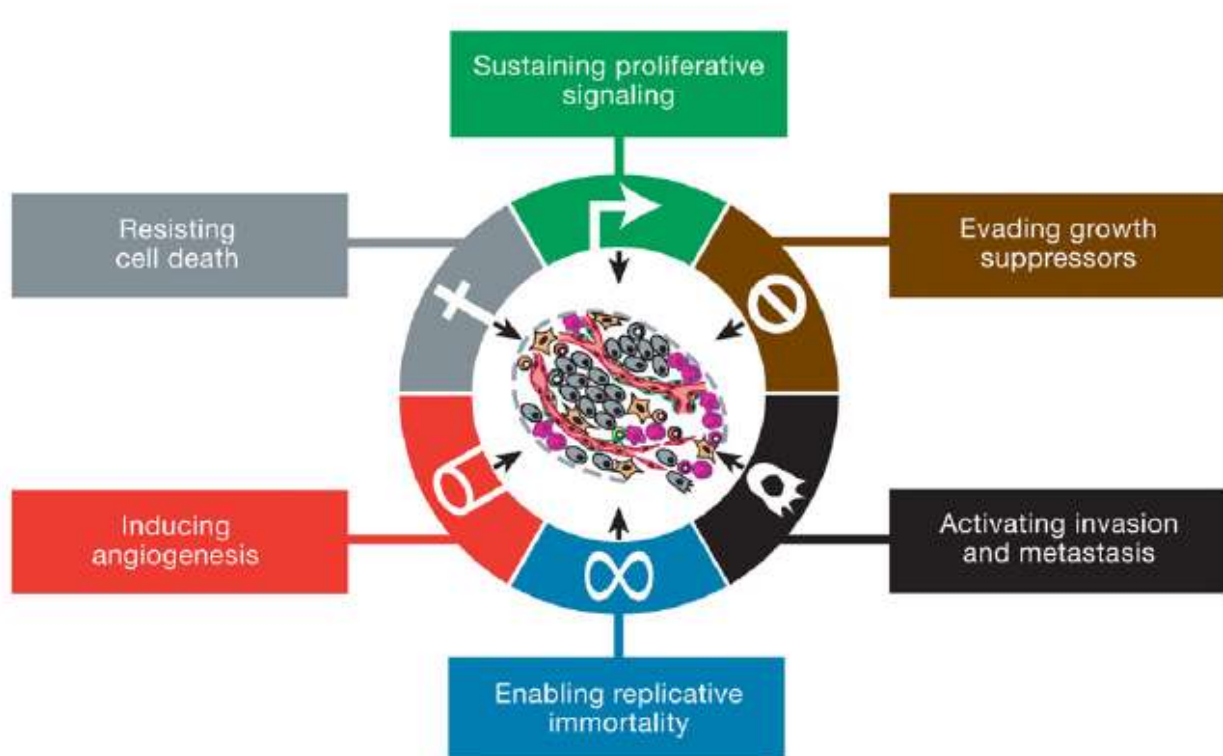
L' antitripsina è quindi un esempio tipico di come una singola mutazione possa avere esiti anche molto diversi.

2. ESSERE COADIUVANTI, PREDISPONENTI O PROMUOVENTI

In realtà i tre termini non sono sinonimi, né sono usati nel loro significato comune. In questo campo vi sono diversi esempi. L'esempio più comune è riferito alle malattie infettive: pur essendo le malattie infettive riferire a una causa primaria(= agente patogeno o suoi prodotti) possono essere favorite da una serie di difetti delle difese dell' ospite che – pur non essendo di per sé causa di malattia- comportano un' aumentata incidenza di malattie . In queste alterazioni delle difese vi sono diversi fattori che comprendono difetti delle difese

- aspecifiche o locali es. tosse (meccanismo di espulsione di secrezioni mucose e ostacola la permanenza di microorganismi nelle vie aeree), e la fibrosi cistica;
- alterazione dalla permeabilità della cute (es. in caso di protesi e cateteri);
- difese innate deficitarie in caso di alterazioni dei neutrofili e neutropenie;
- difetti nel sistema del complemento che portano ad un aumento dei processi infettivi;
- difetti nella risposte T, B, combinata.

All' interno di questo gruppo di cause che appunto predispongono o sono fattori coadiuvanti nello sviluppo di una malattia che è dovuta a un'altra causa primaria è emerso nel corso degli anni il concetto di **CAUSE PROMUOVENTI**: la promozione è un aspetto dello sviluppo del processo patologico sostanzialmente confinato all' insorgenza dei TUMORI e in particolare dei tumori di tipo maligno e da questo punto di vista è necessario fare una piccola premessa su quelle che sono le caratteristiche fondamentali delle cellule neoplastiche maligne che sono state razionalizzate nel 2000 da due ricercatori che hanno condiviso il premio Nobel per i loro studi e riassumono le caratteristiche della formazione neoplastica in sei caratteristiche fondamentali.

Alterazioni caratteristiche sviluppate dalle cellule neoplastiche:

1. AUTOSUFFICIENZA NELLA GENERAZIONE DI SEGNALI INTRACELLULARI

2. CALO DELLA SENSIBILITA A SEGNALI INIBITORI

3. DIMINUZIONE DELLA FREQUENZA DI FENOMENI APOPTOTICI

4. NEO- ANGIOGENESI(importante perché può essere utilizzata come target per individuare e localizzare neoplasie)

5. REPLICAZIONE ILLIMITATA

6. CAPACITA INVASIVA E METASTATICA

1. AUTOSUFFICIENZA NELLA GENERAZIONE DI SEGNALI INTRACELLULARI:

le cellule neoplastiche rilasciano fattori di crescita che sono riconosciuti da specifici recettori che generano segnali in grado di regolare la proliferazione cellulare.

2. CALO DELLA SENSIBILITA A SEGNALI INIBITORI:

inibiscono la proliferazione cellulare.

3. DIMINUZIONE DELLA FREQUENZA DI FENOMENI APOPTOTICI:

quindi si accumulano tumori: la formazione di una massa non è dovuta solo al fatto che le cellule della massa hanno un alto indice mitotico, ma anche alla ridotta apoptosi di tali cellule.

4. NEO- ANGIOGENESI:

capacità di indurre la neoformazione di vasi (importante perché può essere utilizzata come target per individuare e localizzare neoplasie). Il timore provvede al suo nutrimento favorendo la neoformazione vascolare e l' infiltrazione della massa stessa.

5. REPLICAZIONE ILLIMITATA:

le cellule neoplastiche sono dotate di illimitato potenziale proliferativo. Un esempio sono gli esperienti di Hayfleck (*vedi limite di Hayfleck nel numero massimo di divisioni cellulari dovuto a eccessivo accorciamento dei telomeri). Una* cellula differenziata è in grado di compiere un numero limitato di replicazioni (circa 50) quindi se si prende una cellula da animali di diversa taglia e la si studia in vitro esse sono in grado di compiere un numero di replicazioni sempre minori man mano che aumenta la durata delle vita a causa dell' accorciamento dei telomeri. Le cellule neoplastiche hanno dei meccanismi di mantenimento delle sequenze telomeriche che permettono la capacità replicativa.

6. CAPACITA' INVASIVA E METASTATICA:

le cellule neoplastiche maligne sono in grado di invadere il tessuto. Vedremo alcuni aspetti di questo punto più avanti.

Nel 2011 gli stessi due autori hanno scritto un'altra importante rassegna sempre sulla stessa rivista (Cell) rivisitando queste caratteristiche e aggiungendo tutta una serie di dati che hanno suffragato e non contraddetto le ipotesi precedenti, e hanno aggiunto due nuovi aspetti.

Queste **due nuove caratteristiche emergenti** sono intrinseche alla cellula neoplastica e sono rappresentate: **1)** da **un'alterazione del metabolismo energetico**, aspetto noto da moltissimi anni ma che solo negli ultimi tempi è stato investigato, ripreso e attualmente è fonte di grande interesse; **2)** dalla capacità di **cellule neoplastiche maligne di sfuggire** a quello che è un **meccanismo innato di difesa** delle cellule, e si ha in particolare negli organismi multicellulari nei confronti di una crescita anomala rappresentata dalla distruzione delle cellule bersaglio da parte delle cellule tumorali.

La cellula neoplastica infatti adotta tutta una serie di meccanismi per evadere ed evitare le risposte immunitarie , così da venir scambiata per cellula self e non essere degradata.

A questo si aggiungono altre caratteristiche che sono in grado di favorire la crescita neoplastica, anche se queste ultime sono successive all'acquisizione delle sei caratteristiche esemplificate nel grafico. Queste nuove caratteristiche sono **l'instabilità del genoma** e la **stimolazione dell'infiammazione**.

La prima caratteristica è rappresentata dal fatto che le cellule neoplastiche accumulano mutazioni del DNA e questa fenomeno è alla base di una proprietà fondamentale delle cellule neoplastiche stesse detto <u>meccanismo di progressione tumorale</u>, che comporta l'instabilità del genoma e l'accumulo di mutazioni.

Esistono geni che vengono comunemente chiamati proto-oncogeni che regolano alcuni aspetti quali la capacità esplicativa, la dose etc, e che fanno quindi emergere all'interno della massa tumorale dei cloni che sono ancora più maligni. Per questo motivo l'instabilità del genoma è molto importante.

L' altra caratteristica è la **tumor promoting inflammation**, ovvero la capacità di escape delle cellule neoplastiche da meccanismi di difesa dell' immunità.

È stato infatti recentemente apprezzato che cellule neoplastiche sono in grado di secernere o direttamente o indirettamente tutta una serie di fattori che richiamano nella massa neoplastica popolazioni di cellule infiammatorie.

Il concetto di base emerso da questi studi è che le cellule infiammatorie che migrano nel contesto neoplastico per moltissimo tempo sono state considerate un fattore di uccisione delle cellule neoplastiche stesse, almeno come risultato da alcuni studi condotti in vitro, i quali evidenziavano come queste cellule del sistema immunitario (e tra queste i macrofagi nello specifico) potessero uccidere varie tipologie di cellule neoplastiche.

In realtà successivamente si è apprezzata la reale applicazione di tali cellule infiammatorie all'interno del contesto della massa tumorale: esse sono in grado di rilasciare dei fattori tipicamente espressi da questo tipo di cellule -in particolare da quelle della linea mieloide, ad esempio monociti e macrofagi- e favoriscono quindi la crescita tumorale.

Il modo più sintetico per descrivere il significato di questo complesso di osservazioni è stato riassunto da un ricercatore dicendo che il tumore può essere paragonato a una ferita che non guarisce mai: il processo di guarigione delle ferite o di rigenerazione di un tessuto in seguito a un insulto porta infatti alla migrazione di cellule infiammatorie che rilasciano fattori di crescita in concomitanza a tutta un'altra serie di molecole che stimolano la proliferazione cellulare. Lo stesso si verifica nelle neoplasie che si comportano come una falsa ferita che richiama queste cellule e i fattori che stimolano una successiva infiammazione; questa infiammazione non viene però risolta e quindi si protrae molto a lungo nel tempo facendo perdurare la condizione citopatologica.

La promozione dei tumori ha una storia molto vecchia da un certo punto di vista e origina dallo studio dei meccanismi d'azione dei carcinogeni. I carcinogeni sono una serie di molecole alcune delle quali si trovano in natura ; la maggior parte sono però sintetizzati dall'uomo per scopi industriali pratici e necessità varie. Lo studio dell'induzione di un tumore da parte di queste molecole ha permesso una decina di anni fa di definire **TRE TAPPE** nel processo di proliferazione tumorale, che sono poi state anche definite nell'ambito di quella che è detta la storia naturale del tumore. Queste tre tappe sono: l'iniziazione, la progressione e la promozione. La prima tappa è l'**iniziazione**, segue la **promozione** e infine la **progressione** .

- Il concetto di **INIZIAZIONE** è un concetto fondamentale che ha portato a importanti sviluppi nelle ricerche tese a dimostrare che la trasformazione neoplastica è un fenomeno di alterazioni che possono essere di varia natura e interessano la sequenza di una serie di geni . Questi geni come anticipato sono chiamati proto-oncogeni, ovvero sono circa un centinaio di geni che regolano alcune tappe importanti della proliferazione e della sopravvivenza nonché il movimento e altri fenomeni cellulari; mutazioni in questi geni comportano la comparsa di cloni che hanno la caratteristica di cellule neoplastiche. Studiando lo sviluppo neoplastico indotto da mutageni chimici apparve già all'inizio delle ricerche come queste sostanze chimiche potessero indurre la formazione di un tumore anche se non sempre erano sufficienti da sole per determinarne lo sviluppo completo.

- Emerse quindi in seguito il concetto che successivamente all'iniziazione fosse importante introdurre un fenomeno di **PROMOZIONE** che in qualche modo favorisse la proliferazione cellulare di cellule che erano state precedentemente alterate dal carcinogeno nel processo di iniziazione: qualsiasi fattore che favorisca l'infiltrazione in una massa neoplastica di cellule di tipo infiammatorio che rilasciano appunto fattori di crescita può favorire nuove condizioni di danno e quindi la formazione di masse neoplastiche.

- La terza tappa di questa storia è la **PROGRESSIONE** del tumore, la quale ha a che fare con l'instabilità del genoma di cellule neoplastiche che tendono cioè a diventare sempre più maligne, e questo aumento di malignità è dovuto alla sommazione di danni al DNA e di mutazioni in geni rilevanti per il fenotipo neoplastico. Per comprendere storicamente il concetto di promozione è da ricordare brevemente che questa sperimentazione sulla cancerogenesi chimica veniva classicamente fatta con animali di piccole dimensioni e vita relativamente breve (es. ratti e topi) in cui si depilava una parte della cute dell'animale e si instillavano sottocute degli agenti cancerogeni. Questa metodica ad oggi fortemente criticata e non più permessa in Italia ha permesso la raccolta di una massiccia mole di informazioni e soprattutto ha permesso di identificare una serie di in famiglie di cancerogeni in particolare ,ad esempio quelle implicate nel ciclo riproduttivo.
- Questo approccio sperimentale permette di sapere quali sono le sostanze che vanno trattate con una serie di cautele perché il loro prolungato contatto o utilizzo può portare a eventi neoplastici. All'interno di questo protocollo sperimentale si osservò per esempio che la comparsa di un tumore dipende dalla **DOSE** di cancerogeno che si usa:
- l'uso di basse dosi di cancerogeno possono passare da diversi mesi fino a un anno prima che il tumore si manifesti. L'uso di basse dosi dell'iniziatore determina però necessariamente l' insorgenza del tumore se nell'area in cui è stato inoculato l'iniziatore (= molecola chimica) si utilizza un agente pro-infiammatorio detto **promotore.**

- il promuovente di per sé non è in grado di causare il tumore perché non può indurre mutazioni del dna, cosa che fa invece l'iniziatore.
- se si fornisce l'elemento promotore e dopo inculo l'iniziatore il tumore non compare: il tumore compare solo se l'agente promotore trova già delle cellule che sono state iniziate, in cui cioè si è verificata mutazione del dna.
- il promuovente va dato a breve intervallo dal momento di inoculazione e l'altra dell' iniziatore altrimenti viene rimosso.

Schema di trattamento	Risultato	Interpretazione del risultato
I	Assenza di tumore	Il trattamento con il solo iniziante non induce comparsa d tumore
P + P + P + P + P + P + P + P + P + P	Assenza di tumore	Il trattamento col solo agente promovente, anche se lungamen te ripetuto, non induce la comparsa di tumore
I + P + P + P + P + P + P	Comparsa di tumore	Il trattamento con l'agente iniziante seguito da quello cor l'agente promovente determina la comparsa di tumore
I P + P + P	Comparsa di tumore	Se tra il trattamento con l'agente iniziante e quello con l'agente promovente intercorre molto tempo si ha costantemente com parsa di tumore
PPPPPP + I	Assenza di tumore	Se il trattamento con l'agente promovente precede quello cor l'agente iniziante non si ha comparsa di tumore
I + P + P + P + P	Assenza di tumore	Se, dopo il trattamento con l'agente l'iniziante, si fa trascorrere molto tempo tra l'una e l'altra applicazione dell'agente pro movente, non si ha comparsa di tumore, indice della reversibi lità del danno indotto dagli agenti promoventi.

■ **Figura 28.1 - Schema dimostrante i rapporti tra iniziazione e promozione.**
I = trattamento con l'agente iniziante (un cancerogeno in dose subliminale); P = trattamento con l'agente promovent

Per lungo tempo la promozione venne studiata con dei semplici irritanti, e come composto irritante si usò un estratto dell'olio di Croton (una radice il cui estratto idrofobo è irritante).

Dall'olio di Croton si cercò di isolare e purificare l'agente irritante e venne identificato un lipide detto **forbol-mitristato acetato** (derivato dell'acido mirisrico) identificato come la molecola in grado di fungere da promotore del tumore. Gli esteri del forbolo agiscono legando le serin- treonin-chinasi dette **protein chinasi C** (**PKC** con C per Classic) che hanno siti nella membrana plasmatica con struttura simile a quella degli esteri del forbolo. Per tale motivo gli esteri vengono integrati e ancorati alla membrana e causano danno.

La storia della promozione dei tumori fece importanti passi avanti durante gli anni '80 quando si capi che l'attivazione delle PKC in modo artificiale (con gli esteri del forbolo) o naturale (diacilglicerolo) era in grado di spingere una cellula precedentemente iniziata a proliferare; questa proliferazione favoriva inoltre la comparsa successiva di cloni con le caratteristiche neoplastiche. Ciò fu molto importante perché aprì la strada alle vie di trasduzione del segnale che sono in grado di spiegare alcune tappe della progressione neoplastica.

In realtà esistono esempi di promozione di neoplasie umane molto importanti in oncologia.

La tabella (slide 18) mostra alcuni rapporti fra proliferazione cellulare e neoplasie umane che non necessariamente sono sovrapponibili alla promozione perché tutta una serie di ormoni possono indurre tale fenomeno. Va sottolineato che agenti infettivi es. helicobacter pylori (agente eziologico della gastrite cronica e dell' ulcera peptica), virus dell' epatite B a livello epatico, infezioni di protozoi es schistosoma per quanto riguarda cancro di vescica e colon, sono in grado di favorire la progressione di eventi neoplastici attraverso un enorme reclutamento di cellule infiammatorie che rilasciano fattori di crescita e quindi stimolano la proliferazione del tumore.

L'ultima importante caratteristica è la

3. PATOLOGIA MULTIFATTORIALE

Non esiste una causa unica, ma la convergenza di diversi fattori che fanno emergere la malattia. Anche in questo campo tutta una seria di progressi ha permesso di stabilire che il peso di questi fattori non è sempre uguale e vi sono dei fattori che hanno un ruolo principale: un esempio è l'aterosclerosi, in cui è ormai acquisito che il fattore determinante per la lesione aterosclerotica è dato dall' accumulo di lipoproteine es LDL nella tonaca intima vascolare. L'aterosclerosi è una patologia molto importante (circa 50% di mortalità nei paesi sviluppati è dovuto a complicanze delle lesioni aterosclerotiche), è una lesione locale che interessa un punto specifico nella parete dei vasi e colpisce prettamente vasi di medio e grosso calibro come coronarie, vasi cerebrali, vasi che irrorano i muscoli scheletrici degli arti inferiori. Questa patologia è interessante perché riassume in sé moltissimi processi biologici che avvengono nel nostro organismo.

È importante notare che per molto tempo questa patologia non venne interpretata come fattore causale (= causa primaria sufficiente) ma come multifattoriale, cioè non venne interpretata secondo un modello causale semplificato, basato sulla presenza di una causa primaria sufficiente, ma fu affrontato ,studiato e considerato nel contesto della patologia multifattoriale, cioè di convergenza di diversi fattori combinati in diversi soggetti in modo diverso che potevano determinare lo sviluppo della patologia .

Questi fattori vennero identificati soprattutto grazie a studi di tipo epidemiologico e rivelarono la presenza di una correlazione tra un determinato fattore e un'aumentata incidenza della malattia(vedi tabella).

Attualmente si parla di <u>**fattori di rischio**</u> invece che di fattori causali.

Spesso questi fattori vengono considerati come non modificabili, ad esempio la probabilità di sviluppare una lesione aterosclerotica

aumenta con l'età, è più frequente nel genere maschile ,è favorita da una storia familiare di lesioni aterosclerotiche che ovviamente evidenzia il fatto che anche le componenti genetiche sono molto importanti

oppure può essere favorita da fattori definiti in parte modificabili in particolare

iperlipidemia, cioè una quantità più elevata della norma di lipoproteine circolanti deputate al trasporto della quota più importante del colesterolo nel plasma, può essere inoltre favorita da condizioni di vita quali ipertensione, fumo di sigaretta e malattie metaboliche come il diabete.

Vi sono poi tutta una serie di situazioni meno chiare che possono però essere inserite a tutti gli effetti nell'insieme dei fattori di rischio, come soprattutto la carenza post-menopausale di estrogeni che durante il periodo menopausale costituiscono un vantaggio per il genere femminile come fattore protettivo nei confronti del deposito di accumuli di grasso, in post-menopausa, al contrario, si ha un aumento del rischio di sviluppare lesioni aterosclerotiche.

Nel modello delle malattie multifattoriali sono poi emersi anche altri fattori di rischio.

Ovviamente c'è un'importante incrocio tra **fattori genetici** e **fattori ambientali,** per esempio a seconda del genotipo la probabilità di sviluppare una malattia varia a seconda dell'esposizione al rischio ambientale e l'influenza è diversa.

Ad esempio:

1°. mutazioni in una serie di geni possono fare comparire la malattia anche in assenza di esposizione a fattori ambientali;

2°. la malattia compare in modo più marcato se le alterazioni ambientali si correlano alle modificazioni genetiche, mentre modificazioni ambientali da sole senza una caratteristica predisponente genetica creano la malattia ma si ha fenotipo "wild type" con caratteristiche meno marcate;

3°. modificazioni genetiche non comportano lo sviluppo di malattia se

l' esposizione a fattori ambientali è relativamente bassa. Un progresso neoplastico è evidenziabile in caso di media esposizione mentre se aggiungo un ulteriore fattore ambientale al precedente difetto genotipico(cioè non aggiungo cambiamenti genetici)

risponde allo stesso modo. Questa considerazione è una considerazione di base generale e astratta e deve poi essere applicata alla singola malattia.

La famiglia delle malattie multifattoriali, che una volta erano confinate prevalentemente a poche patologie oltre all'aterosclerosi, si sta attualmente allargando progressivamente e include per esempio il morbo di Crohn , importante patologia cronica dell'intestino crasso (large bowel) ed è stato compreso come tutta una serie di fattori molteplici che sono implicati nelle difese immunitarie, ma che possono influenzare uno sviluppo in senso positivo o negativo o più o meno marcato di una patologia sono la correlazione con elementi del sistema immunitario adattativo, quindi il bilancio fra linfociti che stimolano una risposta immunitaria di tipo infiammatorio e quelli che invece la riducono come ad esempio i T-regolatori. L'esito e quindi la risposta dell' organismo può essere dovuta a un'aumentata capacità delle cellule della difesa innata di produrre citochine oppure ad alterazioni nella composizione della flora batterica intestinale che a seconda della sua composizione può stimolare una risposta dell'ospite, che può essere di tipo più spostato verso la risposta infiammatoria o ,viceversa, regolatorio quindi si possono avere delle difese pro-infiammatorie o antiinfiammatorie . Tale argomento costituisce quindi una problematica molto complessa che si sta attualmente espandendo e integrando nuovi concetti della sistemica.

Alterazioni della membrana plasmatica

Tornando alla trattazione della patologia cellulare sulla base della struttura della cellula e dei suoi specifici organelli, all'interno degli organelli specifici esiste una miriade di molecole che possono essere alterate da processi patologici, che possono a loro volta comportare alterazioni cellulari fino ad arrivare alla necrosi.

Le alterazioni della membrana plasmatica che possono determinare una patologia sono classificabili in sostanza in tre grossi gruppi di alterazioni :

1) quelle che derivano da alterazioni grossolane della struttura della membrana plasmatica;

2) le alterazioni del trasporto;

3) tutta la serie di alterazioni dei recettori, sia dal punto di vista della struttura e della loro espressione, sia soprattutto dal punto di vista della funzione dei recettori e della loro capacità di tradurre il segnale all'interno della cellula e quindi regolare il comportamento cellulare.

1) ALTERAZIONI GROSSOLANE DELLA STRUTTURA DELLA MEMBRANA PLASMATICA

Nell'ambito delle alterazioni grossolane della struttura della membrana plasmatica è importante ricordare che la gran parte della superficie della membrana è data da fosfolipidi, i quali possono essere alterati sia nel corso dei processi infettivi sia nel corso di altre patologie ad opera di enzimi come le fosfoLIPASI, che degradano la struttura di fosfolipidi stessi.

Il **fosfolipide** è formato da una molecola di glicerolo a cui sono attaccati due molecole di acidi grassi oppure un gruppo idrofilico che definisce appunto il fosfolipide, e può essere colina- serina- etanolammina- inositolo. Le **fosfolipasi** hanno la capacità di tagliare i trigliceridi in vari siti: per esempio la fosfolipasi A2 libera un acido grasso in posizione 2 del glicerolo; la fosfolipasi C libera il gruppo polare, quindi risulta molto importante nella generazione di segnali extracellulari ; vi sono poi delle fosfolipasi B che liberano sempre un gruppo polare, ma non nella forma fosforilata, lasciando invece l'atomo di fosforo legato al fosfolipide, e viene quindi detto acido fosfatidico. Ci sono poi altre fosfolipasi che possono scindere l'acido grasso in posizione 1 e quindi degradare questa molecola.

Ovviamente questa idrolisi dei fosfolipidi sta alla base di importanti meccanismi di regolazione della funzione della cellula, e quindi una limitata idrolisi di fosfolipidi sta alla base della generazione di molecole biologiche molto importanti, come il gruppo degli eicosanoidi (fosfolipasi A2) e i glicerolo-fosfati, che sono formati dalla fosfolipasi C.

Anche la fosfolipasi D in realtà genera messaggeri come l'acido fosfatidico.

Quindi questo danno strutturale avviene soltanto quando l'alterazione della membrana plasmatica è massiva nei confronti di una serie di fattori che svolgono questo ruolo.

In realtà anche le **tossine batteriche** sono in grado di indurre un danno cellulare con diversi meccanismi: possono degradare la strutture lipidiche o proteiche mediante enzimi e quindi mutare la permeabilità della membrana; un secondo meccanismo più raffinato deriva dal fatto che enzimi rilasciati da alcuni particolari batteri alterano il processo della fusione della membrana vescicolare e quindi, ad esempio, alterano il rilascio di neurotrasmettitori determinando particolari patologie. Il terzo meccanismo è rappresentato dal fatto che vi sono tutta una serie di componenti delle vie di trasduzione del segnale che sono bersaglio di tossine batteriche e possono alterare la trasduzione del segnale con la conseguenza di eccessiva trasmissione del segnale come, nel caso della tossina colerica, o al contrario fenomeni di inibizione del segnale .

Un ultimo importante bersaglio è costituito da componenti del citoscheletro che possono essere modificate dalle tossine batteriche. Tali modificazioni hanno diversi effetti fra cui la induzione di fenomeni di polimerizzazione dell'actina che favorisce l'ingresso di microrganismi nella cellula, e il passaggio di questi microrganismi da una cellula all'altra senza essere bersaglio di componenti difensivi del sistema immunitario .

Per quanto riguarda il <u>primo gruppo</u> ricordiamo stafilococchi e streptococchi che rilasciano una serie di tossine che inducono la formazione di pori e quindi alterano la permeabilità della membrana plasmatica, così come certi microorganismi che rilasciano fosfolipasi e anche sfingomielinasi (presente sulla membrana plasmatica). Vi sono tossine batteriche che rimuovono colesterolo dalla membrana.

Il <u>secondo meccanismo</u> è rappresentato dal fatto che alcune tossine come la neurotossina botulinica e quella tetanica sono enzimi in grado di penetrare nella cellula e degradare alcune componenti strutturali delle vescicole che per esempio contengono neurotrasmettitori. La fusione di granuli di vescicole contenenti neurotrasmettitori con membrana plasmatica richiede la fusione delle due membrane tra loro e questa fusione è mediata dall'interazione tra proteine **V- snare** (sulla membrana della vescicola) e **T-snare** (T per target, presenti sulla faccia interna della membrana plasmatica). Tra le V- snare vi sono la sinaptobrevina e la sinaptogamina, che legano in modo Ca++ dipendente T snare, legate da proteine SNAP25 e sintaxina. **L'aumento di Ca++ citosolico è fondamentale per la fusione delle vescicole**. Il rilascio extracellulare di una vescicola richiede quindi la fusione tra la porzione vescicolare e la membrana plasmatica e il rilascio del neurotrasmettitore richiede l' interazione di queste due proteine vescicolare e target che agiscono in modo strettamente calcio dipendente.

L'aumento del calcio citosolico è un segnale essenziale e determinante per la fusione tra vescicole e membrana plasmatica e questo fenomeno sta alla base non soltanto del rilascio della sostanza contenuta all'interno delle vescicole, ma anche di un altro fattore particolare, per cui ad esempio proteine transmembrana che attraversano la membrana delle vescicole vengono inserite nella membrana plasmatica successivamente alla fusione. La disposizione sulla membrana plasmatica di proteine di norma contenute nello spazio vescicolare è un fenomeno molto importante di modulazione dell'espressione dei recettori che in condizioni basali vengono occultati nelle vescicole e in seguito a stimolazione della cellula vengono esposti.

Esempio: attivazione endoteliale con esposizione di proteine adesive che sono contenute nelle vescicole intracellulare.

Esempio: il fenomeno costituito dall'aggregazione delle piastrine che contengono all'interno del granuli vescicole granulari con diverse proteine, che vengono in parte rilasciate e in parte esposte sulla membrana plasmatica .

<u>**Diverse tossine come quelle tetaniche e botulinica hanno come substrati o V- snare o la T -snare**</u>: la degradazione delle v-snare e delle t-snare impedisce la fusione tra le vescicole e la membrana plasmatica e, dunque, il rilascio del neurotrasmettitore. Questo è il meccanismo molecolare responsabile di paralisi spastica nel caso di tetano, e paralisi flaccida nel caso di tossina botulinica, a seconda della sede di produzione di queste tossine.

Il <u>terzo esempio</u> riguarda i componenti delle vie di trasduzione dei segnali che possono essere inibite o attivate: ad esempio, la bortedella pertussis tossina che inattiva la subunità alpha I delle proteine G trimeriche mantenendole in una conformazione legata a GDP, al contrario della tossina colerica e altre tossine di microrganismi legate al GTP con funzione attivante; le tossine della Clostridium modificano un particolare gruppo di proteine GTPASI; infine, YERSINIA PESTIS è in grado di bloccare la trasduzione di segnale in quanto blocca l'attivazione di tutta una serie di cascate come quella delle MAP CHINASI o la via delle NFKB (= fattori di traslocazione nel nucleo) e sono importanti per l'attivazione di tutta una serie di fenomeni di difesa biologica.Attraverso queste vie gli organismi patogeni possono bloccare i sistemi di difesa.

Abbiamo infine l'interazione con componenti del citoscheletro e fenomeni di ADP glicosilazione della G actina con assemblaggio o disassemblaggio del citoscheletro e conseguente danno cellulare che esita nella necrosi da parte di tossine es clostridium.

L'altro versante importante in questo contesto è invece rappresentato dalla presenza di microrganismi che sfruttano la polimerizzazione dell' actina per favorire la loro integrazione nell'ospite, e meccanismi di movimento all'interno della cellula che consentono di evadere dalle difese innate, per esempio il caso in cui il microrganismo favorisce attivamente la sua integrazione a livello in particolare di cellule intestinali ed è in grado di uscire dalle vescicole e di favorire la polimerizzazione dell' actina muovendosi all'interno della cellula e inserendosi in cellule vicine, evitando lo spazio interstiziale che contiene fattori anti-infettivi.

2) ALTERAZIONI DEL TRASPORTO

Un secondo importante argomento della patologia di membrana è rappresentato dalle patologie del trasportoè il trasporto di membrana è un capitolo molto complesso che comprende trasportatori di diversa natura.

Gli esempi più tipici di patologie del trasportatori riguardano la famiglia ABC (ATP BINDING cassette) regolate sostanzialmente da ATP. In generale i vari tipi di patologie da trasporto vengono classificati in base alla molecola alterata, cioè la molecola che viene trasportata.

Si avranno dunque:

- modificazioni nel trasporto degli aminoacidi;

- alterazioni nel trasporto di mono- o disaccaridi;

- alterazioni di molecole a carica positiva o negativa (anioni e cationi)

Un altro sottogruppo di patologie che sono le CANALOPATIE, cioè alterazioni della funzionalità dei canali che risultano in patologie umane.

Alcuni esempi di canalopatie sono ad esempio le alterazioni nei trasportatori per il cloro: non solo rappresentato dalla classico trasportatore per il cloro CLC1 (clorum Channel 1) o CFTR che è implicato nella fibrosi cistica, ma è il CLC 7 che comporta una patologia definita osteopetrosi, patologia multifattoriale dovuta a svariate caro ed è sostanzialmente caratterizzata da un aumento della matrice ossea minerale dovuta a difetto di riassorbimento degli ioni cloro .

L'osso è una struttura di per sé abbastanza dinamica in quanto si alterano fasi di deposizione e di riassorbimento osseo e il riassorbimento dell'osso è dovuto a un particolare tipo di cellula, gli osteoclasti. Innanzitutto gli osteoclasti sono dei policarioni, ovvero sono formati dalla fusione di più cellule, fino a contenere anche una decina di nuclei. Gli osteoclasti aderiscono saldamente alla matrice ossea e sono caratterizzati da un elemento strutturale particolare (che si vede in sezione), ovvero delle evaginazioni molto strutturate della membrana plasmatica che aderiscono alla matrice ossea, ed è all'interno di questo specifico microambiente che avviene la vera e propria degradazione ossea.Essenzialmente la degradazione ossea si basa sul rilascio di acido cloridrico (HCl) in uno spazio chiuso, il quale scioglie i depositi di ioni calcio.

Le evaginazioni della membrana plasmatica sono dette podosomi, scoperti in diverse cellule da un team italiano di ricercatori verso la fine degli anni 80 il gruppo di scopritori erano dei patologi di Torino diretti da Carlo Marchisio. I podosomi sono quindi estroflessioni o invaginazioni della membrana plasmatica costituiti da un'asse centrale di actina polimerizzata, mentre sulla loro superficie sono presenti delle integrine, e infine legate all'actina ci sono tutta una serie di altre molecole che sono importanti per generare i segnali cellulari, in particolare segnali che fra le varie cose favoriscono il rilascio nel microambiente degli enzimi contenuti nel granuli di questi osteoclasti che sono in grado di degradare anche la componente proteica dell'osso, mentre l'acido cloridrico degrada la matrice di calcio-fosfata depositata.

Gli osteoclasti sono cellule che fanno parte della linea differenziatrice mieloide, cioè sono macrofagi differenziati derivanti da monociti che dal sangue sono passati all'osso, e hanno una vita molto lunga. Per quanto riguarda il processo di differenziamento, queste cellule derivano da cellule macrofagiche di cui, pur essendo molto diverse, conservano molte caratteristiche. La prima differenza è che gli osteoclasti sono policarioni; inoltre hanno uno sviluppo molto accentuato dei podosomi, elementi tipici degli osteoclasti che sono presenti anche nei macrofagi ma con sviluppo inferiore. Il processo di differenziazione viene regolato attraverso due vie:

- una è rappresentato dall'azione di un fattore di crescita la **MCSF** (= macrophage colony stimoulating factor), che è in realtà un fattore di differenziazione di cellule della linea mieloide, che viene riconosciuto da un recettore particolare che fa parte dei recettori per fattori di crescita dotato di attività tirosin chinasica intrinseca;

- l'altro meccanismo di regolazione è basato sul fatto che esistono su queste cellule macrofagiche dei recettori per una molecola transmembrana, **rank-L**, cioè il legando di adesione a chinasi nucleari. La doppia interazione Rank + Rank-l e c- msf stimola la differenziazione monocitaria verso gli osteoclasti, regolata da **pth**

(paratormone). Il **paratormone** aiuta la formazione della forma attiva della

vitamina D3, con funzione di riassorbimento osseo.

Osteoblasti: depositano matrice cellulare e rilasciano molecole inibenti la differenziazione dei monociti in osteoclasti. Esempio: osteoproteserina, inibita da paratormone, in quanto compete con rank per RANK-I.

Sotto il podosoma si crea uno spazio in cui viene rilasciato il cloro. Mutazioni in tale canale riducono l'efficienza del Cl- e protoni H+, provocando quindi una ridotta acidità e conseguente ridotta capacità di degradare la matrice ossea, con conseguente osteopetrosi.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 9/10/2012

Prof. Dusi 09/10/12 Giacomo Brentegani

Malattie in cui sono implicati i radicali liberi

- **Danno da ipoperfusione**: quando c'è un'ipoperfusione (ridotta perfusione di un organo), dovuta a stenosi (restringimento di un vaso sanguigno), shock(condizione di rallentamento generale del circolo con conseguente sofferenza ischemica tissutale), ischemia(ridotto apporto di ossigeno).

In queste condizioni si ha un rallentamento della catena respiratoria mitocondriale con formazione di radicali, perdita di elettroni dalla catena respiratoria, ma anche la xantina deidrogenasi diventa xantina ossidasi che cambia substrato, non utilizza più il NADH ma l'ossigeno e quindi diventa xantina ossidasi; inoltre si accumula l'ipoxantina, che è il suo substrato, perchè aumenta la degradazione dell'ATP. Quindi la xantina ossidasi e il suo substrato sono pronte per funzionare, ma manca l'ossigeno (condizione di ipoperfusione), quindi non si formano tanti radicali durante l'ischemia. Altri radicali derivano dal rilascio di catecolammine. Nell'eventuale riperfusione (quando ritorna il sangue e l'ossigeno) la xantina ossidasi, che intanto si è formata e ha accumulato il suo substrato, entra in azione e comincia a formare grandi quantità di anione superossido (O_2^-) (danno da ischemia/riperfusione); quindi il danno si ha non tanto nell'ipoperfusione ma nella riperfusione, come nel caso del trapianto d'organo quando si espianta l'organo, diventa ischemico, succedono queste cose e quando lo si riallaccia alla circolazione del ricevente il sangue defluisce, riporta l'ossigeno ma ci può essere un danno collaterale da radicali. La stessa cosa succede in un cuore in cui arriva poco ossigeno, il chirurgo fa un bypass ripristinando la circolazione normale(?) ischemica, ma questo ripristino non è sempre indenne, nel senso che ci può essere un danno da radicali con possibili aritmie, problemi di danno dopo l'intervento chirurgico dovuti a questi radicali che si formano nel ripristino della perfusione. Nella riperfusione arrivano anche molti leucociti, che possono essere attivati e cominciare a fagocitare le cellule danneggiate durante l'ischemia, ma si attivano con (*produzione di, ndr*) radicali tramite NADPH ossidasi, quindi contribuiscono al danno per riperfusione. Questo meccanismo avviene negli organi trapiantati, nel miocardio specialmente nella riperfusione postinfartuale, oppure in tutte le ischemie.

(domanda: la trasformazione della xantina deidrogenasi in xantina ossidasi è reversibile?

risposta: no, perchè avviene per una modificazione proteolitica di un pezzo dell'enzima, cioè la calpaina stacca un pezzo. Il ripristino della xantina deidrogenasi deriva dalla sintesi di un nuovo enzima.)

- **Iperossigenazione**: danni al polmone ma anche ad altri sistemi. Troppo ossigeno fa scorrere troppo rapidamente gli elettroni nella catena respiratoria mitocondriale e i mitocondri formano troppi radicali.

- **Cataratta** (opacizzazione del cristallino): un tempo si credeva che il danno al cristallino derivasse da fotoeccitazione. Questo non è più vero perchè si è visto che nel 99% dei casi la cataratta è dovuta ad altri meccanismi. La cataratta è causata prevalentemente da glicazione, cioè legame diretto di glucosio alle strutture del cristallino. Il protrarsi di questo evento porta a opacizzazione del cristallino, infatti (*questo processo, ndr*) è tipico dell'invecchiamento e del diabete.

- **Infiammazione acuta e cronica**: l'infiammazione è una reazione dell'organismo ad un qualsiasi danno, il tessuto diventa rosso, caldo e dolente. Gli attori dell'infiammazione sono i globuli bianchi, i quali sintetizzano NADPH ossidasi, un enzima che serve a difendersi dai batteri attraverso microlisi(?) intracellulare all'interno del fagosoma. Questa NADPH ossidasi può attivarsi non soltanto dentro il fagosoma, ma anche sulla superficie dei globuli bianchi, quindi in tutte le infiammazioni(N.B *tutte le malattie con suffisso -ite sono infiammatorie*) i globuli bianchi, per uccidere i batteri con i radicali liberano anche dei radicali all'esterno della cellula e quindi danneggiano anche i tessuti circostanti. Quindi questo meccanismo ha un effetto doppio: sia di uccisione di batteri, ma per far questo c'è anche un danno collaterale alle cellule del tessuto dove si svolge l'infiammazione.

- **Fotosensibilità**: malattie della fotosensibilità (es. *porfirie*), in seguito ad esposizione solare, la pelle diventa rossa e si formano bolle e ulcere sulla pelle. Le porfirie derivano da alterazioni genetiche che comportano un'alterata sintesi dell'eme, di conseguenza si accumulano precursori dell'eme (porfirine) che si depositano nei vari tessuti, e sono fotosensibili, cioè depositatesi nella pelle assorbono l'energia dei fotoni e diventano eccitate, poi emettono l'energia che hanno accumulato spostando elettroni dagli atomi delle molecole adiacenti delle cellule vicine, e questo comporta un grave danno. Le porfirie danneggiano anche il sistema nervoso con altri meccanismi. Quindi le porfirie sono caratterizzate da danno neurologico che non è legato alla luce e danno cutaneo che è legato alla luce.

- **Sovraccarico di ferro e di rame**: tutte le malattie in cui si accumula ferro e rame sono accompagnate da danno da radicali per la reazione di Fenton, dove il ferro e il rame può catalizzare quella reazione per cui si formano radicali dell'ossigeno perchè il ferro è ossidoriducibile. Queste malattie sono:1) l'emocromatosi, dove c'è troppo ferro nell'organismo e raramente sono dovute alla eccesiva assunzione di ferro, di solito avvengono perchè ci sono alterate proteine(?) che assorbono il ferro in maniera eccesiva a livello gastrointestinale oppure perchè c'è un'eritropoiesi inefficace come nella talassemia e altre anemie, cioè il ferro, che normalmente viene introdotto nell'emoglobina per la costituzione dei globuli rossi, non viene correttamente inserito nell'emoglobina e si accumula nei tessuti. I sintomi clinici sono il colore bronzeo della cute per il deposito di ferro, diabete per la deposizione del ferro nel pancreas che danneggia le isole pancreatiche, alterazioni articolari per la deposizione del ferro nelle articolazione, problemi cardiaci, problemi gonadici o ipogonadismo (?) per la deposizione nei testicoli. 2)Morbo di Wilson è una malattia epatica ed è causata da un'alterazione genica di una proteina che serve per far eliminare l'eccesso di rame nella bile e di conseguenza il rame non viene più legato alla ceruloplasmina, resta nel fegato danneggiandolo sia in quanto atomo di rame sia in quanto catalizzatore della reazione di Fenton esattamente come il ferro.

- **Neoplasie**: in molti tumori c'è un deficit di GSH-perossidasi o di altri sistemi difensivi nei confronti dei radicali, per esempio questo è stato visto negli epatomi del fegato, quindi probabilmente molti tumori derivano dal fatto che le cellule non hanno una sufficiente protezione dai radicali. Questi causano danno al DNA con aumentata mutagenesi e insorgenza del tumore. Però non si sa ancora se il deficit di GSH-perossidasi è la causa di tumore oppure consegue la formazione del tumore. Molti tumori producono un'elevata quantità di radicali liberi dell'ossigeno, che derivano da delle ossidoreduttasi anormali, e sembra che siano implicati in molte caratteristiche tumorali, ad esempio danneggiano il DNA e aggravano la situazione del tumore facendolo diventare sempre più maligno, questo fenomeno viene chiamato progressione tumorale (condizione caratteristica di tutti i tumori che con il passare del tempo si aggrava la malignità). Questo è dovuto anche ai danni prodotti dai radicali sul DNA, facendo in modo che le cellule non muoiano per apoptosi, ma continuino a replicarsi in modo sempre più incontrollabile. I radicali inoltre possono anche danneggiare i tessuti facilitando l'invasione tumorale e inibire le antiproteasi, cioè quei sistemi che servono a difendere i tessuti dalle proteasi tumorali, le quali servono al tumore per superare le barriere presenti nei tessuti che ostacolano la sua progressione. Le antiproteasi sono proteine che bloccano le proteasi tumorali, ma possono essere distrutte tramite ossidazione dalla neoplasia. Inoltre i radicali, ossidando i fattori di trascrizione, possono attivarli inducendo la proliferazione cellulare, cioè la cellula può mantenersi in uno stato di continua autoreplicazione anche grazie al fatto che produce queste ossidasi, le quali producono radicali liberi che attivano il ciclo cellulare agendo in vario modo sui fattori di trascrizione genica.

RIF. SCHEMA SU SLIDE A PAG 20

Alcuni tumori producono radicali in basse quantità, altri in alte quantità addirittura superiore ai leucociti, promuovono la crescita del tumore e l'invasività nei tessuti, facendolo diventare sempre più maligno grazie all'accumulo di mutazioni. In alcuni tumori come i melanomi, le fonti dei radicali sono varie ossidoreduttasi.

- **Invecchiamento**: causato molto probabilmente da un continuo danno ossidativo da radicali che per un po' di tempo viene tamponato da sistemi di protezione delle cellule, ma oltre un certo numero di danni non riescono più a tamponare e la cellula comincia a degenerare e invecchiare. Questo è provato dal fatto che le specie più longeve producono più superossidodismutasi (SOD). Inoltre ci sono molti danni ai mitocondri che portano a privare le cellule di energia, le quali non rinnovano più il proprio corredo di proteine e lipidi e quindi invecchiano. Inoltre diminuiscono i sistemi di riparazione e di protezione nei confronti dei radicali.

- **Carenze di antiossidanti**: deficit di vitamine.

- **Aumento della respirazione cellulare**: danno ossidativo, febbri prolungate, ipertiroidismo con iperossidazione degli ormoni tiroidei, cioè eccessivo metabolismo ossidativo con danno da radicali.

- **Alcolismo**: l'alcool viene smaltito dal sistema MEOS, che se è iperespresso o iperfunzionante produce più radicali. Quindi il reticolo endoplasmatico, per smaltire l'alcool, produce molti più radicali e le cellule vengono così danneggiate. Inoltre si attiva la xantina ossidasi perchè lo smaltimento dell'alcool ad opera dell'alcool deidrogenasi impiega il NAD e lo trasforma in NADH, accumulandolo nella cellula, ma non c'è più NAD^+ per far lavorare la xantina deidrogenasi, quindi scatta il meccanismo per cui per catabolizzare le purine bisogna attivare per forza la xantina ossidasi. Inoltre c'è epatite alcolica con infiltrazione del fegato da parte di cellule infiammatorie e c'è anche il rilascio di radicali dai mitocondri danneggiati.

- **Traumi**: ischemia attiva la xantina ossidasi e l'emorragia causa l'uscita di ferro dai vasi.

- **Danno da radiazione**: soprattutto la radiolisi dell'acqua che porta alla formazione di protoni ed elettroni.

Malattie degenerative del Sistema Nervoso Centrale

Molte di queste sono a eziologia e patogenesi ignota o scarsamente nota. Però si è visto che ci sono molti dati a favore del danno ossidativo da radicali nelle malattie neurologiche.

mMlattia di Alzheimer

E' una patologia che porta a demenza e perdita della memoria. Il danno cerebrale che porta a tutte queste alterazioni è legato in gran parte al fatto che si deposita una proteina chiamata beta-amiloide (proteina a foglietto beta), causando molti danni, in particolare stimola la microglia e i neuroni a produrre radicali dell'ossigeno, che molto probabilmente hanno un ruolo fondamentale nella propagazione del danno.

Sclerosi Laterale Amiotrofica o Malattia di Bering

Insorge all'età di 55-65 anni, in genere inizia con dei crampi, poi i muscoli diventano sempre più deboli e, prima c'è una paralisi di tipo spastico, cioè con contrazioni, poi i muscoli cedono e vanno in degenerazione, arrivando ad una atrofia muscolare (riduzione del volume delle cellule muscolari). In genere si muore quando si paralizzano i muscoli respiratori e non si respira più. Altre complicazioni sono la disfagia (perdita della capacità di deglutire), dislalia (perdita della capacità di parlare), sialorrea (intossicazione di saliva).

Non interessa le funzioni cognitive, quindi non c'è demenza, non c'è alterazione sfinterica, non ci sono tremori e disfunzioni(?) nella coordinazione motoria. Non si conosce il motivo, ma in questa malattia vengono colpiti esclusivamente i neuroni motori. Esistono più tipi di forme: sporadiche, cioè non si sa la causa, ed ereditarie che sono solo il 5%dei casi. E' stata correlata epidemiologicamente parlando a tutta una serie di fattori come precedenti traumi cranici, scosse elettriche che predisporrebbero alla malattia, precedente poliomelite, esposizione a tossine, è stata chiamata anche la malattia professionale dei calciatori... Studi più recenti hanno dimostrato che vere correlazioni statisticamente valide non ci sono se non con il fumo. Nel 20% dei casi delle forme autosomiche dominanti si è visto che c'è una mutazione nel gene che codifica la superossidodismutasi (SOD), questa non è più in grado di smaltire i radicali che danneggiano la cellula. Infatti si è visto che nei motoneuroni, specialmente quelli spinali, c'è un aumento dei gruppi carbonilici, che sono indice di inizio di danno ossidativo. Inoltre questa malattia si può riprodurre nei topi mutando la SOD. Tutto questo ha fatto pensare che la degenerazione dei motoneuroni deriva dal fatto che la SOD non smaltisce più i radicali e quindi questi possono danneggiare i neuroni che muoiono. In realtà ultimi lavori hanno dimostrato che la SOD mutata non solo non funziona più, ma per il suo alterato avvolgimento precipiterebbe all'interno dei neuroni danneggiandoli, dando delle reazioni catalitiche aberranti, alterato trasporto assonico, perturbazione delle funzioni mitocondriali con diminuzione di produzione di ATP e apoptosi dei neuroni.

(domanda: la specificità a cosa è dovuta?Risposta: non si sa)

Si è trovato che in forme autosomiche dominanti la mutazione non riguarda la proteina SOD, ma riguarda un'altra proteina chiamata senataxina, un'elicasi; in altre forme è mutata l'alsina, GEF che controlla le small GTP-binding proteins e i movimenti degli endosomi. Quindi la SLA è dovuta (*alla mutazione, ndr*) di tutta una serie di diverse proteine che portano tutte a degli stessi sintomi, oppure si tratta di una serie di malattie a decorso e quadro molto simile ma distinte. Recentemente è stata scoperta un'altra proteina chiamata TDP-43 (TAR-DNA-binding protein 43), che serve a reprimere la trascrizione permettendo la riparazione prima che si trascriva il DNA. Questa TDP-43 sembra essere implicata (*nella patogenesi della malattia, ndr*). La TDP-43 mutata assume un'alterata conformazione e questo fa si che precipiti e danneggi i neuroni. Alcuni dicono che questa proteina sia implicata nell'Alzheimer e nel Parkinson. Nei modelli murini si è visto che c'è un deficit della cattura (uptake) del glutammato da parte della glia. Il glutammato è il principale eccitatore del cervello, e per evitare un'eccessiva eccitazione dei neuroni, la glia cattura con delle proteine trasporto l'eccesso di glutammato liberato dai neuroni, facendo in modo che non vada a eccitare il neurone postsinaptico. Quindi quando il glutammato non viene tamponato correttamente dalla glia si ha un quadro di eccitotossicità da glutammato, una tossicità legata ad una ipereccitazione dei neuroni per iperproduzione di glutammato. Questo meccanismo è implicato in molte malattie neurologiche. Infatti il glutammato in eccesso lega una serie di recettori: recettori AMPA, canali ionici che fanno passare il sodio nella cellula, quindi depolarizzano la cellula e la eccitano; i recettori NMDA, canali che fanno entrare il calcio; recettori metabotropici, che fanno entrare altro calcio e attivano la fosfolipasi C e attraverso il ciclo degli inositoli mobilizza il calcio dal reticolo endoplasmatico. (La fofsfolipasi C stacca l'inositolo dal fosfato nella posizione 3 del glicerolo e l'inositolo-3-fosfato è in grado di mobilizzare il calcio dal reticolo endoplasmatico.) Quindi con l'eccesso di glutammato viene iperstimolato l'ingresso di calcio e la liberazione di calcio dall'interno(?). L'eccesso di calcio nella cellula attiva le proteasi tra cui quella che trasforma la xantina deidrogenasi in xantina ossidasi, attiva NO ossidasi, attiva anche la fosfolipasi 2 che stacca l'acido arachidonico dalla posizione 2 dei trigliceridi e aumenta quindi il rilascio di glutammato, instaurando un circolo vizioso per cui troppo glutammato causa la formazione di acido arachidonico che fa produrre maggiori quantità di glutammato, questo porta ad una iperstimolazione del neurone a valle, che può andare incontro anche ad apoptosi per lisi osmotica. Quindi l'eccessivo ingresso di sodio e di calcio nei neuroni post-sinaptici può portare alla degenerazione e alla morte. Di conseguenza centrano anche i radicali perchè la produzione degli ioni di perossido di nitrito danneggia (la cellula, *ndr*).

Morbo di Parkinson

Caratterizzato da un tremore a riposo, rigidità muscolare, bradicinesia (rallentamento dei movimenti). Colpisce le persone tra 35 e 85 anni, ma soprattutto verso l'età avanzata. Il 75% sono forme idiopatiche (non si sa la causa), mentre il 25% sono dovute a mutazione genica. Le alterazioni riguardano il corpo striato, sostanza nigra e locus coeruleus, cioè i gangli della base, quei nuclei che controllano le efferenze cerebrali motorie. In tutte le forme c'è una riduzione della trasmissione dopaminergica (i nuclei della base funzionano a dopamina). All'interno delle cellule di questi nuclei si trovano dei grovigli di filamenti, chiamati corpi di Lewy, che contengono una proteina che si chiama alfa-sinucleina, la quale è legata all'ubiquitina. La funzione normale di questa proteina non è chiara, si sa che è molto espressa nel cervello ma anche in altri tessuti, ma si è visto che si può associare alle vescicole pre-sinaptiche regolando il rilascio di neuromediatori, quindi in qualche modo centra con la trasmissione dell'impulso nervoso. Però si è visto che topi privi di alfa-sinucleina non hanno grosse alterazioni (*nella trasmissione dell'impulso, ndr*). Studi ulteriori hanno dimostrato che ci sono almeno 10-12 alterazioni diverse che portano agli stessi sintomi e alla stessa malattia. Nelle forme genetiche sono stati scoperti vari loci genetici chiamati PARK 1, 2, 3, 4, 5, 6,... fino a 12, legati al parkinson, e per esempio alterazioni nel locus PARK1 codifica alfa-sinucleina mutata che aggrega in forma anomala con formazione di filamenti intracellulari; nel PARK4 c'è l'alfa-sinucleina iperespressa, nella forma PARK5 è alterata una proteina chiamata UCH-L1

(ubiquitina carbossi-terminale idrossilasi), che è una componente del proteasoma, nel PARK8 è modificata una proteina chiamata LRRK2/Dardarin, che è una protein chinasi che assomiglia alle MAPKKK. Nelle forme autosomiche recessive c'è il PARK2 che codifica la Parkina, nel PARK6 c'è la PINK1, che è una chinasi mitocondriale, nel PARK7 c'è una proteina di nome DJ-1, che è un antiossidante. Sono stati scoperti altri loci implicati ma per ora non hanno ancora identificato le proteine. Il parkinsonismo secondo me (*prof.Dusi*) non è una sola malattia, è un insieme di diverse malattie che hanno gli stessi sintomi, che colpiscono tutte i gangli della base. Quindi il parkinson deriverebbe da un'alterata struttura e processazione dell'alfa-sinucleina, ma anche da una disfunzione dei mitocondri, alterata attività chinasica e danno ossidativo. Il danno ossidativo nelle forme genetiche non sembra essere molto importante nella patogenesi, ma andando a studiare le forme idiopatiche, si è visto che anche in queste forme c'è un'alterazione dell'alfa-sinucleina e quindi i corpi di Lewy; e si sono osservate delle alterazioni dei mitocondri, dei proteasomi e si suppone che fattori ambientali o radicali liberi dell'ossigeno possano influire sull'aggregazione e sulla processazione dell'alfa-sinucleina. Quindi mentre nelle forme genetiche l'alfa-sinucleina precipita e danneggia i neuroni perchè è geneticamente modificata, nelle forme idiopatiche l'alfa sinucleina precipita perchè viene ossidata da eventi ossidativi. In tutti i pazienti si è visto il pallore della substantia nigra, cioè la sostanza nera dei gangli della base diventa molto più pallida. Questo pallore si ritiene sia dovuto ai radicali liberi dell'ossigeno, prodotti in seguito ad un aumentato e alterato catabolismo della dopamina da parte di un'ossidasi (MAO) nei neuroni dopaminergici, con produzione di acqua ossigenata (H_2O_2). Questo turnover aumenta con l'età e con le anfetamine. Inoltre si è notato in molti pazienti la diminuzione del GSH (glutatione ridotto) nella substantia nigra. Questa diminuzione potrebbe essere dovuta al fatto che il glutatione viene espulso quando è troppo (ossidato?). La neuromelanina, cioè la melanina che ha dato il colore alla sostanza nera, lega il ferro e può quindi catalizzare la reazione di Fenton e quindi produrre radicali. Ancora in alcuni modelli murini si è visto l'attivazione della microglia con produzione di radicali liberi da parte della NADPH ossidasi, processo analogo a quanto avviene nell'Alzheimer. In alcuni pazienti si è trovato un difetto del complesso mitocondriale con perdita di radicali liberi dell'ossigeno e rallentamento del flusso degli elettroni nei mitocondri. Per riprodurre negli animali da laboratorio il Parkinson si possono usare delle sostanze che agiscono sui sistemi(?) ossidativi, ad esempio il rotenone (un insetticida) è un inibitore del complesso I, quindi inibisce l'ubichinone NADH deidrogenasi e quindi il passaggio di elettroni nella catena mitocondriale e riproduce quindi la malattia, facendo sfuggire elettroni. Il modello(?) più usato per riprodurre nel topo il Parkinson è quello della 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), una tossina che blocca i mitocondri e fa aumentare la produzione di radicali e attiva anche le NADPH ossidasi della microglia, infatti non si riesce a riprodurre la malattia nei topi affetti dalla malattia granulomatosa cronica (CGD), malattia in cui la NADPH ossidasi non funziona. Questo significa che i radicali liberi dell'ossigeno e la NADPH ossidasi potrebbero essere implicati nella patogenesi del Parkinson. In vitro, facendo in laboratorio lo stress ossidativo si vede che l'alfa-sinucleina può aggregarsi ossidandosi, causando disfunzione dei proteasomi. Quindi si può dire che sicuramente nel Parkinson giocano un ruolo molto importante le ossidoriduzioni e i radicali liberi dell'ossigeno nel danno ai gangli della base, come poi coordinare tutte queste cose è un punto a cui non si è ancora arrivati, però la protezione dei pazienti da danno da radicali sicuramente è una cosa importante. Inoltre l'alfa-sinucleina induce apoptosi neuronale non solo attraverso i corpi di Lewy, che sono neurotossici, ma anche da oligomeri, cioè piccoli aggregati di alfa-sinucleina con fibrille lunghe, che sarebbero neurotossici. Inoltre la dopamina è in grado di stabilizzare gli oligomeri impedendo la formazione di filamenti più lunghi, questo forse spiegherebbe il perchè il danno avviene nei neuroni dopaminergici e non in tutte le zone del cervello, perchè la grande quantità di dopamina andrebbe a stabilizzare questi oligomeri, danneggiando i punti in cui c'è un bombardamento di dopamina. Riassumendo, nel Parkinson solo i neuroni dopaminergici muoiono per vari fattori, sia ambientali che genetici in seguito ad aggregazione di proteine, disfunzione dei proteasomi e dei mitocondri e alterata attività chinasica, sulla base di difetti geneteci e stress ossidativo che sembra avere un ruolo molto importante.

RIF. SCHEMA SU SLIDE PAG 25

Corea di Huntington *(corea in greco significa ballo)*

Questa malattia è caratterizzata dalla presenza di movimenti involontari e improvvisi, dando la sensazione che il paziente balli, bradicinesia seguita poi da rigidità e deperimento muscolare negli stadi più avanzati. Questa è una malattia solamente genetica autosomica dominante. Ci sono anche alterazioni della corteccia, quindi alterazioni dell'emotività e demenza. I soggetti colpiti sono molto giovani (35-45 anni) ed è mortale in 15-20 anni. E' presente un'atrofia cerebrale (riduzione del volume del cervello generale) e degenera in particolar modo il corpo striato e la corteccia. Si è visto che in tutte le forme della malattia è alterata una proteina chiamata huntingtina, una proteina citoplasmatica che si accumula nei neuroni corticali e del corpo striato. L'alterazione di questa proteina consiste nell'eccesso di residui di glutammina al suo interno, cioè la mutazione consiste nella replicazione della tripletta CAG che codifica per la glutammina. La funzione di questa proteina è sconosciuta, ma si sa che è espressa in vari tessuti, è principalmente citoplasmatica, mentre nella malattia va a finire nel nucleo. L'huntingtina lega una grande quantità di altre proteine e ne modula le funzioni, ad esempio proteine implicate nella secrezione sinaptica, nell'endocitosi, nel citoscheletro, implicate nella regolazione delle caspasi o la caspasi3, mudulando il meccanismo dell'apoptosi. La forma mutata di questa proteina si localizza nel nucleo, dove si suppone che possa alterare la trascrizione, inoltre nel citoplasma è legata a componenti del proteasoma, questo fa pensare che la cellula cerca di smaltirla senza riuscirci, e negli aggregati di huntingtina restano bloccate molte altre proteine e la disfunzione delle quali porterebbe al disastro della corea. Nei meccanismi di degenerazione della corea ritorna il meccanismo dell'eccitotossicità del glutammato. Anche in questo caso si è visto che l'huntingtina è in grado di indurre l'eccitotossicità perchè riduce i recettori del glutammato pre-sinaptici, che servono come sensori dell'eccesso di glutammato, i quali se vengono attivati attivano un meccanismo a feedback negativo che va a diminuire la produzione di glutammato, di conseguenza, se non c'è un sufficiente numero di questi recettori, il glutammato viene continuamente iperprodotto. Aumenta anche la fosforilazione in tirosina dei recettori NMDA, quindi aumenta la loro sensibilità al glutammato; inoltre l'huntingtina si

accumula nel nucleo delle cellule della glia causando una diminuzione dell'espressione di trasportatori di glutammato, quindi riduce la capacità della glia di catturare il glutammato in eccesso. Il risultato di questa situazione è che, non avendo più feedback negativo pre-sinaptico e non avendo più il controllo della cattura dell'eccesso di glutammato da parte della glia, si ha una iperstimolazione del recettore post-sinaptico, quindi iperstimolazione dei neuroni a valle del glutammato, con tutte le conseguenze di prima, cioè ipereccitazione fino alla lisi osmotica per eccessivo ingresso di sodio nelle cellule, aumento della concentrazione di calcio intracellulare con attivazione della xantina ossidasi e produzione di O_2^-, e attivazione dell'NO sintasi (NOS) con formazione di NO e perossinitrito. Gli esperti ritengono che i radicali prodotti da questa iperossidazione da parte del glutammato siano implicati profondamente nel danno post-sinaptico e quindi degenerazione del corpo striato che porta alla corea. C'è un altro meccanismo che è stato recentemente identificato che spiegherebbe il motivo per cui questo meccanismo colpisce solo il corpo striato e non tutti gli altri nuclei cerebrali: lo striato riceve molti impulsi dopaminergici dalla substantia nigra e si è visto che la dopamina può essere tossica nel senso che fa aggregare di più l'huntingtina e, siccome la dopamina è catabolizzata da ossidasi con produzione di H_2O_2 ma anche dall'autossidazione non enzimatica con produzione di chinoni e H_2O_2, un ipercatabolismo della dopamina potrebbe dare un elevato danno ossidativo; inoltre la dopamina può sinergizzare con l'huntingtina e indurre apoptosi con meccanismi che implicano i radicali liberi e alcuni fattori di trascrizione come c-Jun. Quindi in un modello sperimentale dove si pone huntingtina e dopamina (*nella cellula, ndr*) l'apoptosi accelera. Di conseguenza colpisce il corpo striato per l'elevato livello di dopamina, che va incontro a catabolismo anche a causa dell'huntingtina e collabora con essa nell'indurre l'apoptosi del neurone. E' stato dimostrato che nella corea ci sono anche alterazioni dei mitocondri con diminuita attività di quasi tutti i complessi mitocondriali a livello dello striato con ridotta produzione di ATP. Non si sa la causa di questo processo, ma sicuramente è implicata l'huntingtina, perchè si è visto che può alterare varie funzioni mitocondriali, non solo attraverso l'attivazione delle caspasi, ma anche (*troppa confusione*). Di conseguenza sicuramente l'huntingtina danneggia i mitocondri, i quali liberano radicali. Quindi lo stress ossidativo deriverebbe da: eccitotossicità del glutammato, metabolismo della dopamina e danno mitocondriale. I radicali prodotti danneggiano i neuroni con tutti i meccanismi visti nella lezione precedente.

Infine si può dire che i radicali giocano un ruolo importante in tutte queste malattie. Il meccanismo patogenetico è abbastanza simile, infatti c'è una proteina neuronale o mediatore che si altera, precipita nelle cellule senza essere smaltito, si accumula e diventa tossico. Questo accumulo può avvenire sia perchè è mutata geneticamente sia perchè arrivano dall'esterno dei fattori, per esempio ossidoriduzioni, che causano il misfolded della proteina, cioè un alterato avvolgimento della struttura terziaria della proteina, che ne riduce la funzione. In tutto questo giocano un ruolo importante i radicali liberi, perchè il sistema nervoso centrale è molto sensibile al danno da radicali per il fatto che è ricco di grassi insaturi, facili prede di lipoperossidazione, consuma molto ossigeno, i neuroni sono ricchi di lisosomi, nei quali i radicali agiscono causando il rilascio di enzimi lisosomiali, e sono ricchi di ferro, quindi possono catalizzare la reazione di Fenton, inoltre la degradazione dei neurormoni produce H_2O_2, soprattutto delle catecolammine.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 10/10/2012

CARIDHA DENIS

PROF: BERTON GIORGIO

DATA: 10/10/2012

DANNI MEMBRANA PLASMATICA

Ricorda brevemente

Il premio nobel per il 2012 è stato assegnato a due ricercatori, John Gurdon e Shinja Yamanaka, per la caratterizzazione delle cellule staminali.

***Gordon** ha fato un esperimento prendendo un ovocito di rana e trasferendolo nel nucleo di un girino. Questo uovo seguì tutto il patern differenziativo che portò alla generazione di un nuovo girino. Con informazioni apparentemente e relativamente limitate in quanto non molto precise, dimostrò che il nucleo di una cellula somatica non solo conteneva tutte le informazioni neccessarie a formare un organismo intero, ma poteva anche essere regolato. Nel senso che la trascrizione dei geni che sono implicati nel processo di differenziamento poteva essere regolato e portare allo sviluppo di un animale adulto.*

***Yamanaka** invece fu il pioniere di quella tecnica che portò alla formazione di iPSC. Prendendo le cellule somatiche differenziate,come i fibroblasti, indusse la trascrizione in queste cellule di una seria di geni, che poi si sono rivelati sufficienti a*

formare una cellula pluripotente, in grado di generare un organismo adulto. Per queste scoperte l'applicazione pratica è ancora da rivedere, ma comunque queste sono delle tappe importanti per quella che ormai viene chiamata la ***medicina rigenerativa****.*

LE CANALOPATIE

Le **canalopatie,** causano una patologia rara, con lesione muscolare e con conseguenze patologiche a livello di cellule e tessuti dell'organismo. Provoca anche l'**osteoporosi**. *(affrontate nella lezione precedente, ndr)*

Inoltre, le canalopatie sono dovute alle mutazioni che riguardano una classe di recettori, **RYR1 e RYR2** (fig. 1), coinvolti nei meccanismi di regolazione dell'omeostasi del Ca2+.

Queste 2 molecole devono il loro nome al fatto di essere recettori per la **rianodina**, che è un alcaloide che si usa solo per scopi sperimentali, cioè per aprire questi canali. RYR1 e RYR2 sono fondamentali per la regolazione del flusso di Ca2+ nel citosol delle cellule muscolari, rispettivamente scheletriche e cardiache. In questi distretti i meccanismi di regolazione sono sostanzialmente diversi per l'aumento del calcio citosolico, che probabilmente è essenziale per il fenomeno della contrazione. (**figura 1)**

Nel muscolo scheletrico il recettore RYR1 è in qualche modo accoppiato a un sensore di voltaggio, cioè un canale abortito che non trasporta elettroliti. Nel momento in cui si ha il fenomeno della depolarizzazione, trasmettono modificazioni conformazionali a RYR2 che è espresso nel reticolo sarcoplasmico (RS). Quest'ultimo nel muscolo è la struttura deputata all'accumulo di Ca2+ in condizioni di riposo. La modificazione conformazionale di RYR1 permette l'uscita di Ca2+ dal reticolo sarcoplasmico nel citosol consentendo la contrazione muscolare. Sostanzialmente, il recettore per la rianodina è un canale per il Ca2+ che viene regolato in modo diverso dagli altri canali. In questo caso vengono regolati da un evento di depolarizzazione che trasmette una modificazione conformazionale al recettore per RYR1 che comporta un rilascio di Ca2+ dal reticolo sarcoplasmico(RS). **È importante ricordare che questo meccanismo particolare di rilascio di calcio dal reticolo sarcoplasmico nel muscolo scheletrico è il meccanismo che spiega come mai la contrazione muscolare del m.scheletrico isolato sia indipendente dalla presenza di Ca2+ nel terreno in cui si mette la fibra muscolare isolata. Questo perchè basta depolarizzare la membrana plasmatica, poichè il Ca2+ non ha bisogno di entrare dall'esterno, ma viene liberato dal RS attraverso questi canali per il Ca2+. I canali risentono di una modificazione conformazionale che viene trasmessa per la loro sensibilità alla modificazione del voltaggio.**

La situazione è invece diversa nel muscolo cardiaco.

Studiando una fibra muscolare cardiaca in vitro, essa ha bisogno di Ca2+ extracellulare per la sua contrazione. Il motivo è dovuto al fatto che in questo caso il rilascio di Ca2+ dal RS, è mediato dal recettore **RYR2** *(canale per la rianidina)*, il quale è regolato in modo diverso dal RYR1, ossia da un meccanismo che è chiamato **calcium induced calcium released,** cioè rilascio del calcio indotto dal calcio. Questo meccanismo dipende da un canale che è un classico **VOC** (voltage operated calcium channel), anch'esso regolato da modificazione del voltaggio, cioè da un evento di depolarizzazione. Il voltaggio apre il canale, che fa entrare calcio dall'esterno in modo massivo. Quest'ultimo modifica la struttura conformazionale del RYR2 legandosi ad esso e determina la sua apertura. Così, si ha una seconda ondata molto più massiva a prolungata di uscita di Ca2+ dal RS.

Vi sono delle patologie derivate da mutazioni nei geni che codificano per RYR1 e RYR2.

Nel caso di **RYR1** abbiamo due diverse patologie:

- **Central core desease:** patologia molto rara caratterizzata da debolezza muscolare; dovuta ad alterazioni della velocità di apertura di RYR1 al livello del muscolo.
- **Ipertemia maligna:** patologia più frequente; è imprevedibile, si manifesta come complicanza di interventi chirurgici che richiedono anestesia generale da una seria di anestetici; RYR1, che presenta una seria di mutazioni, è ipersensibile a questi anestetici e si apre un in modo massivo e prolungato; questo comporta un ingente ingresso di calcio nella cellula muscolare scheletrica con fenomeni di contrazione muscolare continua e con generazione abnorme di calore. Richiede procedure d'urgenza perchè può essere mortale in una notevole percentuale di casi.

Nel caso di **RYR 2**, che è espresso nel muscolo cardiaco:

- **tachicardia ventricolare:** dovuta a mutazioni nel gene di RYR2. Sorge in particolare in seguito all'esercizio fisico o eventi di stress emozionali dove c'è il rilascio di catecolamine. Questi episodi richiedono interventi urgenti perchè non possono essere compatibili con la vita.

(lezione 3.2)...Nell' ambito delle canalopatie esistono delle alterazioni di trasportatori molto importanti che vengono classificati all'interno di una famiglia abbastanza ampia, detta dei **trasportatori ABC** (ATP-binding cassette protein). Sono dei trasportatori

che vengono regolati dal legame con ATP. Non sono delle ATPasi, ma l'ATP regola la funzione di questi trasportatori. All'interno di questi trasportatori ABC le modificazioni diverse dei loro geni possono determinare diverse patologie. I 4 tipi di geni di questa famiglia di trasportatori da ricordare sono: ABCA1, ABCC7, ABCC8 e ABCG5/8, che danno delle patologie (di seguito riportate) molto diverse tra loro, perchè la differenza è sostanzialmente data dal tipo di molecola che questi trasportatori appunto trasportano.

1. **1. Malattia di Tangerin →** sorse in una piccola isola in North Carolina dove, per effetto dell'isolamento, gli incrocio tra famigliari hanno determinato una segregazione di mutazioni in questo gene (**ABCA1**) e lo sviluppo di questa malattia, che è rara. Essa si accompagna da un alterazione importante nel metabolismo di una classe particolare di lipoproteine. La conseguenza è che i soggetti affetti sviluppano aterosclerosi molto precocemente. È una delle malattie che ha rappresentato un livello di studio importante per comprendere la patogenesi dell'aterosclerosi e in particolare per comprendere il rapporto tra alterazioni dell'assetto lipidico, sopratutto delle lipoproteine circolanti nel plasma, e aterosclerosi. Il trasportatore ABCA1 trasporta sostanzialmente colesterolo dalla periferia al fegato.
2. **2. Sitosterolemia →** la mutazione del gene **ABCG5/8** porta all'alterazione di trasporto di steroidi di origine vegetale; anche in questo caso la conseguenza è lo sviluppo prematuro di aterosclerosi.

Che cosa sono le lipoproteine?

Sono forme molecolari maggiori di trasporto di lipidi nei liquidi biologici, in particolare nel plasma che altrimenti da qui non potrebbero essere trasportati direttamente. L'unica eccezione è rappresentata da diverse classi libere che vengono trasportate nel plasma legate all'albumina, la quale ha delle tasche idrofobiche, per mezzo delle quali può legare le molecole idrofobiche.

Figura 2

Le lipoproteine rimangono comunque la struttura principale di trasporto di lipidi, che è rappresentata dalle **micelle**.

Esse sono costituite da:

- **coat**: un singolo strato di fosfolipidi, non un doppio strato come la membrana delle cellule eucariote. Questo strato ha proprietà anfotera, cioè le molecole hanno una parte idrofobica e una parte polare che può interagire con l'acqua. In esso vi si trova anche
  - colesterolo non esterificato: come si verifica nel resto delle membrane delle cellule eucariotiche. Anche il colesterolo non esterificato è una molecola anfotera.
  - Apolipoproteine: una serie di proteine (complessi tra proteine e lipidi) delle quali esistono diverse forme; le principali sono A, B, C ed E.

- **core** : struttura centrale, che porta i lipidi. Questi lipidi idrofobici che non possono entrare in contatto con le cellule idrosolubili sono rappresentati da trigliceridi e esteri di colesterolo. Al gruppo idrossilico del colesterolo può essere legata una molecola idrofobica, acido grasso o altre molecole, *(registrazione disturbata,NdR)....dagli* esteri del colestrolo che non è piu inseribile sulla faccia esterna della membrana.

Le diverse classi di lipoproteine vengono sintetizzate in diversi tessuti e hanno un diverso destino. L'intestino assorbe le molecole lipidiche, acidi grassi e colesterolo libero derivato dalla degradazione degli alimenti. Poi assembla questi lipidi in una lipoproteina particolare che è il **chilomicrone.**

Il **chilomicrone** è la lipoproteina di maggiore dimensioni ed è composta per il 90% da trigliceridi. Aumenta maggiormente nelle prime ore dopo un pasto ricco di lipidi. Il chilomicrone, per le sue dimensioni notevoli, non può passare attraverso l'endotelio della mucosa intestinale, ma viene drenato dalla linfa e passa poi nel circolo sanguigno. Durante il trasporto nel sangue, l'evento critico che si verifica è la modificazione del chilomicrone. Esso si rimpicciolisce per il fatto della perdita dei componenti del core, come i trigliceridi che vengono idrolizzati in acidi grassi e successivamente liberati. Quest'ultimi vengono poi assorbiti dal tessuto e utilizzati per la recovering e in particolare per la sintesi di ATP e per l'accumulo.

Questo fenomeno di modificazione evidenzia un aspetto centrale del metabolismo delle lipoproteine, che dipende da una serie di ordigni specifici regolati da componenti della cellula stessa. Nel caso dei chilomicroni, è un enzima, la **lipoproteinlipasi,** che degrada i trigliceridi e libera acidi grassi che modificano la struttura dei chilomicroni. L'enzima è regolato nella sua attività, decine di volte in senso di aumento, da una apoproteina dei chilomicroni stessi: la **ApoC**. L'interazione tra quest'ultima e l'enzima trattiene per un tempo breve il chilomicrone in determinati distretti e consente di degradare la sua struttura. La distruzione della lipoproteinlipasi non è stocastica. Nel senso che ci sono alcuni distretti nel microcircolo, dove passano i chilomicroni, che sono

arricchiti di lipoproteinlipasi. È molto logico osservare che il microcircolo di tessuti più ricchi di questo enzima è quello di tessuti che utilizzano, anche se con scopi molto diversi e in modo molto efficiente, gli acidi grassi liberati. Questi sono il microcircolo del m.scheletrico e il microcircolo del tessuto adiposo.

- **Nel m.scheletrico** l'acido grasso va in contro a B-ossidazione che è essenziale per la sintesi di ATP e di cheratin-P per dotare il muscolo di molecole che sono importanti per la produzione di energia durante la contrazione muscolare.
- **Nel tessuto adiposo** l'acido grasso liberato dai chilomicroni viene riconvertito in trigliceridi e serve per l'accumulo, cioè per il deposito di materiale nutritivo in attesa di periodi di digiuno.

I chilomicroni così modificati vengono rinominati "**residui di chilomicroni**" e vengono internalizzati mediante recettori specifici degli epatociti. Il fegato è una stazione fondamentale di metabolismo dei grassi. Esso utilizza una parte degli acidi grassi per la sintesi di ATP mentre l'altra parte viene riassemblata, formando cosi un'altra lipoproteina che è la **VLDL** (very low density lipoprotein) che è la proteina maggiore secreta dal fegato.

La VLDL ha alcune caratteristiche tipiche dei chilomicroni, compreso innanzitutto il fatto di essere ricca di ApoC, cioè di quella proteina che consente la sua modificazione. Quindi si rimpicciolisce perdendo acidi grassi e diventa quella che viene chiamata **IDL**(intermediate density lipoprotein) e infine **LDL**(low density lipoprotein).

Le LDL

Si ricorda che oltre a questa perdita di acidi grassi, il circolo nel plasma modifica anche l'assetto apoproteico di queste molecole, in particolare l'LDL non contiene più ApoC. Essa contiene esclusivamente una singola apoproteina. Questa LDL non è piu modificabile, è una forma di lipoproteina più stabile ed è la forma maggiore di lipoproteine circolanti nel plasma, nelle circa 3 ore successive ad un pasto. Le LDL sono fondamentali in patologia, in quanto esiste un principio stabilito da diversi protocolli sperimentali sulle azioni chimiche che definisce che **maggiore è la quantità di LDL circolanti, maggiore è il rischio di sviluppare lesioni aterosclerotiche.** Cioè esiste un rischio maggiore nelle arterie di medio e di grosso calibro che si formino strutture costituite innanzitutto da un infiltrazione di lipidi, che sono le LDL, e che evolvono secondo un pathway infiammatorio in una lesione importante dei vasi arteriosi, responsabili di diffusissime patologie.

le LDL come anche altre forme però possono essere internalizzate dai tessuti periferici per l'utilizzo di questi lipidi.

La fig. 3 mostra le differenze tra le diverse lipoproteine. I trigliceridi, il colesterolo esterificato e le diverse apoproteine hanno dimensioni varie. La LDL ha una singola apoproteina che è l'**ApoB100**.

-

Le HDL

Nella figura sono visibili anche le lipoproteine chiamate **HDL**(high density lipoprotein) che sono coinvolte nella malattia di Tangè. Esse sono le più piccole e le maggiormente dotate di una particolare apoproteina, l'**ApoA**, che ha un ruolo specifico nel loro destino.

I chilomicroni hanno un ApoB48, mentre le VLDL, IDL, LDL hanno invece un ApoB100. Questi numeri si riferiscono al loro peso molecolare, ma l'aspetto interessante è che queste proteine vengono codificate a partire dallo stesso gene. **Cioè un gene può codificare diverse proteine,** perchè l'mRNA può essere modificato. In questo caso, la tripletta CAA che codifica per glutammina (nelle cellule intestinali dell'uomo, in un'altra specie e anche nel fegato) viene modificata dalla deaminasi intestinale, per cui la citosina diventa un uracile. Il codone formato, UAA, è un codone di STOP. Perciò, mentre nelle cellule del fegato dell'uomo il gene per l'ApoB100 dà una proteina di 100KDa, nell'intestino attraverso questo meccanismo la sintesi proteica viene troncata e viene sintetizzata la molecola di 48KDa. Le funzioni di quest'ultima sono analoghe a quelle di ApoB100 e tra loro forse c'è solo una differenza di affinità per il recettore ma queste sono delle questioni non molte chiare.

Un accenno: Le lipoproteine vengono caratterizzate da una migrazione elettroforetica. Questo è svolto per le cellule del siero e le diverse lipoproteine migrano in modo diverso. I chilomicroni sono cosi grandi che non entrano nel gel di poliacrilamide e non migrano verso il polo negativo. La migrazione delle altre è dettata dal peso molecolare ma non solo, per cui le HDL che sono le più piccole migrano maggiormente nei tempi impostati per definire questa migrazione; cosi vanno a costituire la banda"alfa" (fig.4). Sopra di esse si trovano le VLDL e HDL e sopra ancora le LDL/IDL. In realtà si aspettava il contrario, ma per le caratteristiche fisio-chimiche delle VLDL queste migrano di più delle LDL e vanno a costituire la banda "pre-beta". Questo classico posto di separazione delle lipoproteine plasmatiche, sieriche è molto iportante perchè consente di identificare l'aumento di una lipoproteina rispetto ad un'altra. Vi sono una serie di malattie del metabolismo che comportano l'aumento di una o l'altra di queste bande e di queste diverse lipoproteine.**figura 4**

Le Apoproteine

Le apoproteine sono delle componenti essenziali delle lipoproteine. In particolare l'ApoB100 che è presente su tutte le lipoproteine che derivano dal fegato (quindi le VLDL, IDL, LDL) e che costituiscono il ligando per il recettore.

Nei chilomicroni invece questa capacità di interagire con i recettori è mediata da ApoB48.

Due apoproteine ApoA e ApoC hanno come funzione quella di attivare enzimi.

La **ApoC** attiva la lipoproteinlipasi ed è presente nelle VLDL,LDL e nei chilomicroni. Mentre **ApoA** è l'attivatore enzimatico di acetiltrasferasi ed è specifica per le HDL dove svolge un azione nel destino di strutturazione di queste proteine.

L'altra importante apoproteina è la **ApoE** che è presente in VLDL, IDL, HDL e chilomicroni e la cui funzione è essere il ligando per il recettore. Quindi sostanzialmente abbiamo due ligandi per recettore (ApoB e ApoE) e due attivatori per enzimi (ApoA e ApoC). Tutte le lipoproteine, eccetto le HDL, contengono due ligandi per recettori; mentre l'unico ligando per il recettore presente sulle LDL è l'ApoB100. Questa è la base molecolare che stabilisce che: **qualsiasi alterazione del recettore per l'ApoB100 comporta un aumento delle LDL circolanti, ma non delle altre lipoproteine che possono entrare dentro le cellule attraverso il recettore che riconosce l'ApoE.** Questo è un altro paradigma essenziale nella comprensione della patogenesi dell'aterosclerosi, perchè, se esistono delle evidenze che maggiore è la quantità delle LDL, maggiore è il rischio di sviluppo di lesioni aterosclerotiche, allora è anche vero che: minore è l'espressione del recettore che riconosce ApoB100, cioè che non riconosce LDL, maggiore è la loro quantità in circolo. Quindi maggiore è il rischio di sviluppare lesioni aterosclerotiche!

Esistono anche delle proteine modificate chiamate **Apo(a)**, che non sono altro che ApoB100 modificate dall'attacco covalente di altre sequenze di apoproteina; ha un funzione fisiologicamente non nota e patologicamente è stato suggerito che sia in grado di inibire i processi fibrinolitici.

La regolazione della funzione delle HDL, è importante perchè esse sono considerate come dei fattori protettivi a rischio aterosclerotico.

Le lipoproteine hanno un'origine molto eterogenea, perchè possono essere secrete dagli epatociti come dischi di fosfolipidi contenenti ApoA, o possono essere formate anche da cellule intestinali oppure nei tessuti periferici. Queste molecole nella forma iniziale sono chiamate anche **pre-B-HDL**, perchè sono dei piccoli dischi di fosfolipidi, ovvero micelle costituite da un singolo strato di fosfolipidi contenenti prevalentemente ApoA e successivamente acquisiscono anche le altre apoproteine, come ApoE.

Le pre-B-HDL modificano la loro struttura e diventano quelle che vengono chiamate anche **a-HDL**, o HDL matura. Le a-HDL acquisiscono altre apoproteine e accumulano al loro interno anche degli esteri di colesterolo, aumentando le loro dimensioni. Cioè sono molecole che sono in grado di acquisire colesterolo dai tessuti periferici, immagazzinarlo nel core centrale e modificare la loro struttura.

Questo fenomeno è mediato anche da proteine specifiche come le **PTLP** (phospholipid transfer protein) acquisendo ApoE e legano colestrolo libero sulla faccia esterna del singolo strato di fospolipidi. Il colesterolo libero però, seppure ricopra la superficie di queste molecole, è soggetto di esterificazione dalle lipoproteine. Ciò comporta che queste molecole lo accumulano all'interno del core e liberano così la superficie, per essere disponibili a legare altro colesterolo nei tessuti periferici.

L'esterificazione deriva dal fatto che le HDL contengono l'enzima **LCAT**(lecitina colesterolo aciltransferasi) regolata da ApoA che consente l'esterificazione del colesterolo e la liberazione sulla superficie della lipoproteina di specifiche molecole. Le HDL così strutturate possono raggiungere il fegato e vengono riconosciute da un recettore specifico; comunque possono anche cedere colesterolo che è stato rimosso dai tessuti periferici alle altre lipoproteine. La cessione e mediata da una proteina chiamata **CETP** (colesteryl esther transfer protein). Ciò definisce una sorta di circolo vizioso superfluo, nel senso che queste lipoproteine che hanno rimosso colesterolo dalle periferie e lo cedono alle lipoproteine circolanti, non fanno altro che riportarlo in periferia.

C'è stata una caccia ai farmaci che bloccassero il CETP e quindi favorissero questo pathway, cioè il trasporto di colesterolo dalla periferia al fegato e lì poi venir eliminato da una serie di meccanismi. I farmaci per bloccare la CETP ci sono, ma si è visto che avevano delle complicanze di tipo ipertensivo, e per questo sono stati tolti dal mercato.

L'acquisizione di colesterolo libero dalle cellule di tessuti periferici richiede l'espressione di **ABCA1**. Esso in qualche modo favorisce il trasferimento di colesterolo alle HDL e la lesione del gene per questo recettore comporta un enorme accumulo di colesterolo nei tessuti, dal momento che non può essere ceduto alle HDL attive. C'è anche un altro trasportatore, **ABCG1**, che trasferisce colesterolo invece alle cellule premature.

Come è legato questo gruppo di ABC protein con le canalopatie?

Lesioni di questo gene comportano alterazioni di conformazione delle HDL attive; un abnorme accumulo di colesterolo nei tessuti perferici è un fattore importante nello sviluppo di lesioni aterosclerotiche, in quanto: **maggiore è la quantità di colesterolo presente nei tessuti periferici, minore è l'espressione del recettore per le LDL e di conseguenza maggiore è la quantità di**

LDL circolanti nel plasma, che comporta una maggiore probabilità che queste finiscano nelle arterie iniziando un processo aterosclerotico.

Altre patologie hanno modificazione nel gene che codifica per ABCG5/8 determinando quella che viene chiamata **sitosterolemia**, che è dovuta ad un accumulo non di colesterolo ma di steroidi vegetali nei tessuti periferici. Questi trasportatori sono espressi prevalentemente nella membrana apicale delle cellule intestinali e nelle cellule epatiche a livello del canalicolo biliare. La funzione di questi trasportatori è importante nella strutturazione dei chilomicroni. Nel senso che colesterolo e steroidi vegetali sono assorbiti attraverso lo stesso trasportatore e quindi vengono in una prima fase incorporati all'interno di endosomi che poi raggiungono il reticolo endoplasmico, nella stessa misura. Però a questo livello c'è un *sorting*, per cui gli steroidi vegetali vengono riespulsi dalla cellula intestinale e quindi il chilomicrone che si forma contiene quasi esclusivamente colesterolo. La mancanza o non funzionamento di questi geni fa in modo che per *defold* vengano incorporate nel chilomicrone anche steroidi vegetali che vengono poi accumulati ai tessuti. Questa osservazione, che colesterolo e steroidi vegetali vengono internalizzati attraverso lo stesso trasportatore, è quella che sta alla base delle convinzioni biochimiche. Gli elementi degli steroidi vegetali inducono l'assunzione del colesterolo e poi questi steroidi vegetali vengono facilmente esclusi dalla cellula. Quindi si hanno dei meccanismi che consentono di controllare la colesterolemia che è importante nella patogenesi dell'ateroslerosi.

3) **Fibrosi cistica (FC)** → L'altra importante patologia dovuta a lesioni dei geni che codificano per proteine appartenenti alle ABC protein è rappresentata da mutazione nel **gene ABCC7** (*il numero indica il cromosoma su cui è localizzato questo gene*) che codifica per una proteina molto complessa chiamata **CFTR** (cystic fibrosis transmembrane receptor). Mutazioni di questo gene sono responsabili di quella che è la grave patologia genetica più diffusa nella popolazione caucasica: la fibrosi cistica. Essa è stata definita come una malattia autonoma circa gli anni '30 come una patologia della prima infanzia, dovuta a importanti alterazioni della caratteristica dei secreti di diverse ghiandole mucose ma non solo. *Si è pensato ad una possibile terapia genica e quindi di veicolare il gene funzionante nelle cellule dell'organismo di un paziente affetto dalla malattia, ma questa terapia si è rilevata impossibile*. Gli altri dati significativi sono non soltanto un gruppo di nuovi farmaci che consentono di ritardare le conseguenze patologiche della malattia, ma anche una seria di test che consentono di modificare le mutazioni più frequenti del gene CFTR. E infine dal punto di vista sperimentale lo sviluppo di una serie di problemi animali; il topo e più recentemente il maiale, che è più simile dal punto di vista degli organi all'uomo, è considerato un modello molto interessante per la comprensione di questa malattia.

La fibrosi cistica è una **tubulopatia ostruttiva** che deriva da alterazioni della conduttanza di una serie di ioni, in particolare il Cl-, anche perchè è stato recentemente enfatizzato l'importanza di trasporto di HCO3-. Questa alterazione della conduttanza del Cl- determina una ridotta idratazione dei secreti di molte ghiandole. I secreti risultano iperconcentrati, cioè la solubilità delle proteine contenuti in questi secreti mucosi diminuisce, e quindi si ha un aumento di viscosità e calcificazione dei secreti che determina questa tubulopatia ostruttiva.

Nella fig.5 sono rappresentate le conseguenze molto importanti che si possono osservare.

a) A livello del **pacreas**

le patologie pancreatiche sono quelle che hanno dato il nome a questa malattia. È il pancreas che va incontro a un processo fibrotico cistico. Il deflusso dei secreti pancreatici lungo i dotti pancreatici, che poi sboccano nell'intestino, determina un aumento di pressione, per cui gli acini ghiandolari si rigonfiano (da qui il termine cistico) e al tempo stesso il ridotto deflusso di enzimi pancreatici porta all'autodigestione del pancreas attraverso l'innesco di processi infiammatori che evolvono in un processo di tipo fibrotico. Quindi il pancreas viene sostituito da connettivo interstiziale fibrotico da cui emergono palloni rappresentati dagli acini ghiandolari che si sono dilatati nel corso del processo patologico e che definiscono questa malattia.**figura 5**

E' una patologia che riguarda il pancreas esocrino; inoltre, il processo fibrotico prolungato porta ad un'altra complicanza, che si vede sempre più spesso nei soggetti con la fibrosi cistica, che compromettere le isole pancreatiche che secernano insulina facendo comparire un diabete insulino-dipendente (che non è un diabete giovanile perchè si può osservare anche nell'adulto ed è dovuto alla distruzione del parenchima pancreatico che è la componente endocrina).

Le **pancreatiti** sono una possibile complicanza, cioè rilasciano in circolo gli enzimi pancreatici, che però non si vedono molto spesso.

b) A livello dell'**intestino**

E' importante solo nelle prime settimane di vita. Come complicanza che si trovo nel circa 30% dei soggetti affetti da FB si puo identificare come **ileo da meconio**. Quest'ultimo è il contenuto intestinale che si forma durante lo sviluppo intrauterino. Il feto mangia liquido amniotico, cellule desquamate etc., e si forma un aggregato di cellule nel tubulo gastroenterico definito meconio, che sono delle vere e propie feci. Solitamente esso viene espulso nei primi giorni di vita. In una percentuale di casi di soggetti affetti da FC, la ridotta idratazione intestinale comporta un alterazione di espulsione del meconio che può ristagnare nel intestino e può dare origine a questa patologia acuta che richiede l'asportazione chirurgica del meconio che non riesce ad essere eliminato.

c) A livello del **fegato**

La complicanza è un'ispessimento della bile con ritardata espulsione della bile nell'intestino, quindi un ristagno della bile nella cistifellea e nei dotti epatici. Il fenomeno di ristagno porta alla **cirrosi biliare**. Questo è un processo patologico del fegato dovuto a una patologia a valle del fegato, cioè che interessa le vie biliari.

d) A livello dei **dotti deferenti**

L'**infertilità maschile** è una complicanza frequenta della FC; invece più rara è l'infertilità femminile. Questa è dovuta al fatto che c'è una azoospermia. La progressione del liquido spermatico è sostanzialmente ostacolata. Ci sono dei fenomeni di riorganizzazione del deferente stesso con alterazione nell'espulsione dello sperma.

e) A livello del **polmone**(Last but not least-come ha detto il prof..... :P)

Il polmone è un organo complesso. Uno degli aspetti peculiari è dovuto al fatto che ci sono diversi tipi di cellule nella mucosa bronchiale e diversi tipi di ghiandole, tra cui le mucipare, che secernano glicoproteine, muco. Quest'ultime sono essenziali per le difese biologiche perchè intrappolano microrganismi che vengono espulsi poi mediante il battito cigliare insieme al secreto mucoso. Questo meccanismo di difesa locale impedisce l'attecchimento di una serie di agenti patogeni. Invece la viscosità e la densità dei secreti mucosi polmonari nella FC comporta l'impianto di una serie di microrganismo che danno origine a infezioni ricorrenti nelle vie aeree sotto forma di **broncopolmoniti**. Essa comporta trattamenti ripetuti, a seconda della gravità del processo, con antibiotici. Innescano tra l'altro un circuito vizioso rappresentato da un proccesso infiammatorio continuo. Certamente per difendersi dall'infezione bisogna reclutare cellule infiammatorie, che però hanno un effetto deprimente, cioè alterando la struttura polmonare e innescando un processo infiammatorio cronico del polmone con fibrosi e progressiva alterazione dello scambio nelle vie aeree. Il polmone di un soggetto di 30-40 anni con la FC è come quello di un forte fumatore di 80 anni che è un polmone estremamente alterato da un processo fibrotico. L'ultimo approccio terapeutico che si sta diffondendo è quello di trapianto del polmone. La FC non interessa solo una cellula o un organo ma molti organi e l'intero organismo perchè ci sono una serie di complicanze da considerare.

La CFTR

La **CFTR** è una proteina che ha la struttura tipica di una ABC protein. È composta da due domini che contengono diverse sequenze idrofobiche che attraversano la membrana plasmatica. Sono dei trasportatori che si assemblano a formare una specie di struttura a forma di cono che attraversa la membrana plasmatica stessa ed è composta da due **NBD** (nucleotide binding domain). La funzione di questo trasportatore è regolata dal legame con ATP che apre il canale.

La particolarità della CFTR, che non c'è nelle altre ABC binding protein, è l'essere dotata del **dominio R** (regulatory domain). La regolazione è essenziale nella funzione del canale in condizioni normali. Il dominio R funziona come un tappo per questo canale. Cioè quando la struttura è assemblata, il tappo si attacca a questa struttura a forma di cono e blocca il trasporto di una serie di molecole. Se viene fosforilato, il dominio regolatore si distacca e quindi permette il funzionamento del canale.

La CFTR va incontro a un complesso processo di proccessing. In particolare, essendo una proteina di membrana viene glicosilata nel reticolo endoplasmico, sopratutto nel Golgi, ed è essenziale per il targeting della molecola sulla faccia esterna della membrana plasmatica. L'importanza di questo processo deriva dallo studio delle mutazione del gene per CFTR, che oggi sono arrivate a 1800 diverse mutazioni. Essa può essere anche chiamata diagnosi del portatore, una malattia autosomica recessiva che in forma eterozigote dà segno della sua patologia. Normalmente è utile fare una diagnosi del portatore per un'informazione genetica delle copie eterozigote che hanno un rischio aumentato di avere un figlio omozigote, quindi con la patologia. Esiste comunque una mutazione a più alta frequenza nella popolazione, circa 70% dei casi, ed è la cosi detta **ΔF508**. Questa mutazione ha a che fare con una delezione della fenilalanina in posizione 508. Nell'ambito della patologia cellulare-molecolare, la ΔF508 altera questo processo di proccessing, poichè la proteina non viene glicosilata e permane nel comparto cellulare vescicolare impedendo cosi il targeting della molecola nella superficie plasmatica. L'accumulo della proteina nel comparto del reticolo del Golgi porta ad un'altra possibile conseguenza patologica non dovuta alla non presenza della proteina sulla membrana plasmatica, ma dovuta alla unfolding protein respons. Questo abnorme accumulo di CFTR nel reticolo innescherebbe quel processo che porta ad un aumentata trascrizione di geni pro-infiammatori, che spiegherebbe anche il perchè nella FC oltre ad avere un'aumentata incidenza di infezioni del polmone, c'è anche quella che è stato chiamato un eccesso di infiammazione, rispetto alla necessità di uccidere i microrganismi patogeni.

Le diverse mutazioni sono classificate in diverse classi:

- **classe I** → comportamutazioni che sono responsabili di un difetto di sintesi della CFTR
- **classe II** → comporta quella del ΔF508; c'è un alterazione post-traduzionale dove si ha un accumulo nel RE e Golgi, perché non c'è glicosilazione
- **classe III** → mutazione che comportano un alterata regolazione, cioè nel NBD o nel dominio R che alterano la regolazione del canale
- **classe IV** → c'è un alterata conduzione dovuta a mutazioni nei domini transmembranali che poi formano il canale vero e proprio e, quindi, il passaggio di Cl- è alterato

Le conseguenze di queste mutazioni sono diverse a livello del fenotipo (è meglio avere una proteina che funziona poco che non averla per niente). Le classi I e II sono quelle che comportano un fenotipo più grave, perchè la proteina o non viene sintetizzata o non va dove serve. Mentre le classi III e IV comportano una ridotta funzione e quindi un fenotipo in generale meno grave.

I **geni modificatori** a parità di mutazioni i fenotipi possono essere anche molto differenti. Questo non è dovuto alla mutazione del gene responsabile della malattia ma è dovuto a mutazioni in altri geni che regolano altri tipi di processi.

Le diverse classi sono aggredibili in modo diverso con approcci farmacologici. Per esempio, alterazioni di regolazione e sopratutto quelle di conduzione, sono quelle su cui si cerca di identificare molecole che aprano efficacemente questo canale del cloro, per evitare l'accumulo all'interno della cellula.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 15/10/2012

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 15-10-2012

Sbobinatore: Annarita Comini

prof.Berton Giorgio

CANALOPATIE PARTE II

Ricorda dalla lezione precedente: La causa patologica molecolare della fibrosi cistica è dovuta al prodotto del gene sul cromosoma 7 che può essere alterato con conseguente alterazione di funzione. La molecola CFTR crea infatti un canale per gli anioni sia cloro che bicarbonato che altri fisiologicamente importanti come mai un'alterazione così specifica sulla membrana plasmatica è in grado di determinare una patologia complessa.

SECREZIONE E RIASSORBIMENTO INTESTINALE DI CLORO:

Bisogna fare un passo indietro sui diversi aspetti del trasporto di anioni e cationi . Nell'intestino, nel colon, esiste un sistema separato di riassorbimento degli elettroliti e quindi dell'acqua. All'apice dei villi le Surface Cells, le cellule superficiali dei villi, hanno un sistema di riassorbimento del sodio che è accoppiato ad un riassorbimento anche netto del cloro; poi sodio e cloro escono poi dalla membrana basolaterale attraverso specifici sistemi di trasporto, ovvero canali per il cloro che non sono i cftr. *(Vedi slide 24 lezione 3.2)*

Nelle cellule quindi questo è il sistema che permette il riassorbimento di sodio cloruro a livello dell'apice dei villi intestinali. Questo riassorbimento di sodio cloruro è accompagnato dall'assorbimento di acqua per una questione osmotica ed è importante nell'assorbimento di liquidi a livello intestinale.

Esistono anche altri sistemi, in particolare vi è un sistema accoppiato di co-trasporto sodio-glucosio che è un trasporto facilitato per il sodio mediato dal trasporto di glucosio (questo ha un interesse specifico in una serie di patologie).

Nelle cellule delle cripte vi è invece un sistema di secrezione per il cloro (che è stato caratterizzato già alcuni decenni fa). Questo sistema di secrezione per il cloro accoppiato ad altri trasportatori nella membrana basolaterale (ad esempio c'è un cotrasportatore con due clori, un potassio e un sodio per garantire la neutralità, è quindi un co-trasportatore) porta dentro la cellula cloro, mentre sodio e potassio riescono per le loro vie.

Nelle cellule della base delle cripte intestinali c'è un sistema di secrezione del cloro sulla membrana apicale delle cellule intestinali. Questo è un sistema di secrezione del cloro nel lume; è presente in tutte le superfici mucose, in particolare nel distretto respiratorio e nei dotti secretori di alcune ghiandole esocrine come a livello pancreatico o negli efferenti. E' questo sistema difettivo che è responsabile di una serie di patologie. Passando a considerare un'altra mucosa e cioè quella delle vie aeree troviamo un sistema di secrezione del cloro che ritarda il riassorbimento di sodio e quindi assicura una corretta idratazione dei secreti mucosi. Nella fibrosi cistica **la mancanza o la difettiva funzione di questo trasportatore per il cloro** determina un **eccessivo assorbimento di sodio e di acqua** all'interno della cellula, e quindi una **deidratazione della mucosa**. Questo meccanismo difettivo è uno schema generale che vale per i dotti pancreatici, le vie biliari, i deferenti, lo stesso intestino(anche se in quel caso la secrezione del cloro e il riassorbimento del sodio sono regionalizzate in distretti diversi) , ecc.

L'eccezione a questo sistema, che è caratterizzato prevalentemente da un ruolo della CFTR come sistema di secrezione del cloro, è rappresentato dalla **ghiandola sudoripara.** Questa è una ghiandola particolare la cui finalità è sostanzialmente quella di disperdere calore immettendo sulla superficie cutanea acqua relativamente povera di elettroliti. La struttura di tale ghiandola è molto semplice: è dotata di un gomitolo secretorio che secerne liquido che ha la stessa composizione dei liquidi extracellulari(quindi circa 140mM sodio cloruro) e questo liquido, secreto con basse concentrazioni di potassio(5mM), poichè non è una ghiandola mucosa,non contiene glicoproteine, contrariamente a secreti più complessi come quelli delle vie aeree. La caratteristica della ghiandola sudoripara è quella di avere un dotto di riassorbimento che consente quello che viene chiamato **risparmio di Sali**: ogni volta che noi eliminiamo acqua ricca di elettroliti è utile risparmiare una parte dei sali che altrimenti andrebbero persi rischiando quella che viene anche chiamata **sindrome da deplezione di sali**, cioè una situazione di iponatremia.

Digressione: *questa sindrome di deplezione di sali fece definire la fibrosi cistica come una malattia pediatrica ben precisa. Infatti in un ospedale americano durante un'estate molto calda si verificò un guasto all'impianto di raffreddamento e i bambini affetti da fibrosi cistica svilupparono una "salt losing syndrome" e questo consentì a questo medico americano di collegare i due tipi di patologia.*

GHIANDOLA SUDIRIPARA:

Quindi nel dotto di riassorbimento della ghiandola sudoripara si verifica un riassorbimento di cloro accompagnato al riassorbimento di sodio ed in parte indipendente dal riassorbimento di acqua. La ghiandola sudoripara è uno dei due distretti del nostro organismo in cui la membrana plasmatica non è permeabile all'acqua e quindi l'acqua non si sposta esclusivamente secondo la driving force rappresentata dall'osmolarità. Se questa membrana fosse come tutte le membrane in tutte le altre cellule il riassorbimento di sodio cloruro comporterebbe un riassorbimento di acqua. La ghiandola sudoripara invece vuole riassorbire il sodio cloruro e disperdere l'acqua. (L'altro distretto importante in cui c'è questa permeabilità reattiva all'acqua è rappresentato da alcuni distretti dei tubuli di riassorbimento renale).

Normalmente, quindi, il sudore –che all'origine del gomitolo secretorio presenta una concentrazione di 140mM NaCl- che arriva alla cute ha una concentrazione di NaCl di circa 30mM proprio a causa del riassorbimento.

Nel soggetto con la fibrosi cistica la concentrazione del sudore arriva fino 100-110 mM e per questo il test del sudore costituisce ancora un test essenziale, al di là della biologia molecolare o del sequenziamento del gene per identificare le mutazioni, per diagnosticare la fibrosi cistica. Dalla nascita i bambini affetti da fibrosi cistica hanno una concentrazione salina nel sudore con sodio cloruro superiore al normale attorno ai 100-110 mM

(DIAPO 26 LEZ 3.2: *La TABELLA fa la sintesi di quelle che sono le composizioni dei liquidi extracellulari ed intracellulari che* <u>va memorizzata molto bene</u> *perché molto importante anche dal punto di vista pratico).*

Il modello che ha permesso di collegare le alterazioni di funzione della CFTR alla disidratazione dei secreti mucosi delle vie aeree e quindi al circuito di aumento di viscosità del muco e intrappolamento di particolari microrganismi (in particolare Pseudomonas aeruginosa) con conseguente ridotta eliminazione e ristagno di questo muco nelle via aeree nel circuito infezione – infiammazione, è stato notevolmente rivisto negli ultimi anni. La ridotta idratazione del muco è comunque un fenomeno essenziale, determinante; l'aumento di viscosità è anche uno dei principali bersagli terapeutici: si stanno caratterizzando una serie di farmaci che aumentino la conduttività al cloro di cftr con mutazioni alteranti l'apertura del canale e anche altri che possono aprire anche altri canali aggiuntivi per il cloro.

Vi sono tuttavia delle complicazioni:

- ### IMPORTANZA DI CFTR COME CANALE PER IL BICARBONATO:

Alcuni studi molto interessanti suggerirebbero che la ridotta secrezione di bicarbonato da parte della cftr sia importante nel mantenere le mucine che vengono secrete da cellule particolari. Una ridotta secrezione di bicarbonato manterrebbe le mucine, ovvero glicoproteine che vengono secrete sulle superfici di diverse mucose, in uno **stato aggregato**. Questo stato di aggregazione viene mantenuto nel soggetto che soffre di FC per un'interazione con protoni e con ioni calcio; Normalmente, invece, in seguito alla secrezione di bicarbonato, si ha un distacco di queste molecole e la formazione di mucine disaggregate. È un passo avanti importante, sposta l'attenzione sulla possibilità di aumentare la quantità di bicarbonato nelle vie aeree e di conseguenza favorire

la disaggregazione di mucine e quindi la fluidità del muco dando il recupero di una funzione quasi normale di eliminazione da parte delle ciglia del muco secreto.

- ## INFIAMMAZIONE E FIBROSI CISTICA:

Una serie di osservazioni che si sono accumulate nel corso degli anni ha suggerito che nella fibrosi cistica si verifica a livello delle vie aeree un'**eccessiva infiammazione**, cioè il reclutamento di cellule dell'infiammazione e soprattutto di cellule della fase acuta dell'infiammazione (cioè polimorfonucleati neutrofili). Tale reclutamento è eccessivo anche rispetto all'infezione, cioè all'impianto di microrganismi patogeni.

Questa eccessiva infiammazione ovviamente ha due conseguenze importanti:

1.infiammazionedi tipo cronico: il processo infiammatorio è direttamente collegato alla riparazione fibrotica quindi eccesso di infiammazione significa eccesso di fibrosi polmonare e quindi alterazione della funzione polmonare che si verifica nei soggetti con fibrosi cistica;

2.Il secondo aspetto di questa eccessiva infiammazione è proprio relativa invece a una sorta di , di circolo vizioso, rappresentato dal fatto che i neutrofili che vengono richiamati in grande quantità nelle vie aeree dei soggetti affetti da fibrosi cistica vanno incontro a processi che rilasciano DNA . Il DNA è una delle cose più viscose che esistano e quindi questo eccessivo accumulo di DNA peggiora le caratteristiche fisico-chimiche dei secreti aumentando la viscosità e favorendo il ristagno di questi secreti nelle vie aeree.

Questa nozione che nei secreti dei soggetti affetti da fibrosi cistica c'è un eccesso di DNA libero (che provoca aumentata viscosità) ha portato all'uso di farmaci con DNAasi somministrate per favorire la degradazione del DNA e l'eliminazione di questo circolo vizioso.

BASI MOLECOLARI DELL'ECCESSIVA INFIAMMAZIONE:

Alcuni hanno ipotizzato che una riduzione di ASL (Airway Surface Liquid) che bagna la superficie mucosa, comporti un aumento di viscosità di per sé del secreto mucoso (anche perché c'è poco bicarbonato). E questo ovviamente porta a una riduzione del battito ciliare e una riduzione del lavaggio delle vie aeree, cosa che favorisce l'infezione con P. aeruginosa.

Però la CFTR mutata sarebbe di per sé responsabile di altri fenomeni:

1. il fatto che **l'accumulo della CFTR** (questo è stato visto soprattutto per la mutazione deltaF508 ovvero quella mutazione che comporta l'accumulo da cftr nel reticolo endoplasmico e nel Golgi)

- innesca una serie di segnali che **inibisca i processi autofagici** ;

- innesca quel danno e quella **stress response nel reticolo endoplasmico** che favorisce la trascrizione di geni che codificano per molecole pro infiammatorie.

1. Nelle cellule con mutazioni da cftr si ha **l'accumulo di un particolare fosfolipide, la ceramide,** la quale è in grado di mediare diversi tipi di fenomeni compreso di mediare una aumentata morte cellulare.

Quindi l'inibizione dell'autofagia e l'accumulo da ceramide favorirebbero una **desquamazione** delle cellule dell'epitelio, che a loro volta **rilasciano ulteriormente acidi nucleici** e quindi aumentano la viscosità.

1. Vi sono però anche altri elementi oggi interpretati nel contesto dell'unfolded protein response, cioè **l'accumulo di proteine mutate nei comparti intracellulari** che portano a un'aumentata trascrizione da parte di cellule mucose respiratorie **di IL-8** e altre citochine.

IL-8 è una chemochina fondamentale per richiamare neutrofili dal vaso nell'interstizio polmonare e nell'alveolo stesso. In questo caso è stato visto verificarsi una sorta di circuito per cui, per esempio, i neutrofili presentano diversi recettori per IL-8; Tali recettori sono sostanzialmente 2(*CXCR1 e CXCR2*), uno di questi è importante per le difese biologiche, cioè la capacità dei neutrofili di uccidere microorganismi. Tale recettore può però essere clivato da proteasi rilasciate in particolare da P.aeruginosa ma anche da altre cellule, ai neutrofili rimane così soltanto il secondo recettore per IL-8, il CXCR. Tale recettore è stato implicato

recentemente nel fenomeno di formazione di **NeTs cioè Neutrophil Extracellular Traps (=rilascio di filamenti di DNS dei neutrofili).**

(Vedere slide 30 lezione 3.2.Rappresenta un lavoro pubblicato su Nature nel settembre 2010. Nell'immagine si vedono fibre di DNA colorate con colorante particolare che permettono di identificare i NeTs. Con questo lavoro su Nature si dimostrò un paio d'anni fa che addirittura la quantità di Nets presenti correla in qualche modo un'identità del danno polmonare evidenziabile con valore di Forced Espiratory Volume . Questo solo per dire che la patogenesi del danno polmonare sta diventando veramente molto complessa, è infatti dovuta a disidratazione del secreto mucoso, inoltre probabilmente dovuta ad una aumentata aggregazione di mucine ed è probabilmente peggiorata da una eccessiva risposta infiammatoria e dal rilascio nelle vie aeree di acidi nucleici rilasciati appunto dai neutrofili.)

GENI MODIFICATORI E FIBROSI CISTICA:

La fibrosi cistica è una malattia genetica che sta attirando molta attenzione nel campo di quelli che vengono chiamati **geni modificatori**.

Il concetto del gene modificatore è emerso per arricchire definizioni che esistono da tempo vale a dire anche prima della patologia molecolare o delle possibilità di sequenziare specifici geni. Già si sapeva, infatti, che l'espressività di una malattia genetica può variare da soggetto a soggetto.

Nel caso della fibrosi cistica la variabilità di fenotipo è notevole. Il modello di studio attuale è molto rigoroso ed è basato sostanzialmente sulla osservazione di soggetti che hanno lo stesso genotipo, ovvero la stessa mutazione e in forma omozigote.

Chiaramente la gravità di una malattia può essere determinata dal tipo di mutazione o di alterazione genetica, nel senso che è sempre meglio avere una proteina alterata piuttosto che non averla del tutto. Ma per fare bene questo studio dei geni modificatori bisogna farlo su soggetti che hanno la stessa mutazione in forma omozigote, in cui entrambi gli alleli presentano la stessa mutazione. Altrimenti potremmo avere la situazione dell'eterozigosi composta in cui potrebbe essere che la mutazione di un allele venga in parte compensata dalla mutazione dell'altro. Perciò sono stati selezionati diverse centinaia anzi migliaia di pazienti che presentano la mutazione più frequente, cioè la ΔF508 in entrambi gli alleli; l'osservazione clinica di questi due gruppi di pazienti fa vedere che lo spettro con cui si manifesta la malattia è estremamente variabile.

(DIAPO 31 LEZ 3.2) Abbiamo addirittura gruppi di casi in cui l'unica patologia è l'azoospermia senza patologia pancreatica e polmonare, a casi in cui abbiamo la forma di fibrosi cistica classica con grave danno pancreatico e polmonare e alterazioni epatiche.

Che cosa spiega questo spettro così diverso di espressività della malattia nonostante le alterazioni genetiche siano le stesse?

E' emerso questo concetto di geni modificatori per cui si sta cercando, sequenziando tutti i geni di questi soggetti per identificare **le mutazioni che possono esser ad esempio protettive o peggiorative dello stato di malattia.** Su questo non c'è ancora un totale consenso però ci sono alcune cose che stanno emergendo. Ad esempio sembra che alcuni dei geni che vengono modificati siano dei geni che regolano lo sviluppo del processo infiammatorio, quindi dei soggetti che hanno una maggiore capacità di limitare i processi infiammatori fibrotici o dei soggetti che hanno una maggiore capacità di utilizzare dei meccanismi di difesa aspecifici (rappresentati ad es. da una serie di fattori presenti nei liquidi biologici) avrebbero una minore espressione di questo tipo di malattia.

CFTR E COLERA:

La cftr è anche una proteina che può essere il bersaglio di una tossina batterica, la **tossina colerica**, la quale è in grado di determinare invece **un'eccessiva apertura della cftr in un distretto selettivo, ovvero l'intestino**.

Questa eccessiva apertura della cftr comporta complicanze importanti nell'infezione da Vibrio cholerae cioè **la diarrea acquosa** che può portare anche a una perdita di 10-20 litri di acqua nell'arco di una giornata e se non corretta rapidamente è incompatibile con la vita. Quindi questa è una **patologia da eccesso di funzione di cftr** e questa patologia ci porta a ricordare che nell'ambito dei diversi meccanismi di trasduzione del segnale da parte dei recettori di membrana, uno dei 3 meccanismi fondamentali identificati è rappresentato da una serie di recettori (che sono i più rappresentativi nella membrana di cellule eucariote) che sono definiti "recettori accoppiati a proteine G"(proteine G sono trimeriche).

(*La comprensione del meccanismo di trasduzione del segnale da parte di questi recettori ha portato la scorsa settimana all'assegnazione del premio nobel x la chimica*).

Le proteine G trimeriche sono comopste da 3 subunità: alfa, beta, gamma. Le subunità alfa sono inoltre classificate in vari modi, ma ci limitiamo a trattare la subunità αs(alfa esse) chiamata cosi perché la "s" sta per "stimolatoria" ed è in grado di stimolare l'enzima adenilato ciclasi che converte ATP in AMP ciclico. L'cAMP è un potente attivatore di una serin-treonina citoplasmatica.

La protein-chinasi A(chiamata A perché è regolata dal cAMP) fosforila quel sito regolatore R (*vedi disegno su struttura del cftr*). Nella forma fosforilata questo sito regolatore si stacca dal canale e quindi il canale è costantemente aperto.

REGOLAZIONE DELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE DA PARTE DELLE PROTEINE TRIMERICHE:

Nella forma a riposo, quindi senza agonista, la proteina G αs è legata a GDP ed è complessata alle subunità beta e gamma. Il legame con un recettore determina una modificazione conformazionale della G αs per cui si stacca GDP e si lega GTP (ricorda che GTP è 10 volte più concentrato di GDP nella cellula). Per cui inducendo il distacco di GDP per la legge di induzione di massa si lega più GTP che GDP.

Nella forma legata a GTP la G αs-GTP è in grado di legarsi ad una serie di fattori, in questo caso trattandosi di αs si lega alll'adenilato ciclasi. Le subunità beta-gamma invece si staccano dalla G αs legata a GTP e interagiscono con altri effettori che ora non ci interessano. Questo sistema è finemente regolato, al punto che la subunità G α è una molecola ha un'attività GTPasica intrinseca che quindi consente al sistema di essere attiva per un tempuscolo e successivamente questa attivatà GTPasica degrada GTP e lo riconverte in GDP e nella forma legata a GDP la G αs si ricomplessa alla subunità beta-gamma spegnendo quindi sia i segnali di G α che quelli di beta-gamma.

Questa attività GTPasica è regolata da diversi sistemi. Uno è un meccanismo esogeno basato sull'azione di tossine batteriche che modificano la G αs attraverso una modificazione enzimatica covalente ovvero una **ATP ribosilazione** la quale inibisce l'attività GTPasica intrinseca della G αs. La conseguenza è che per default si ha uno spostamento dell'equilibrio verso la forma di G αs legata a GTP e quindi **una costante attivazione** dell'adenilato ciclasi con formazione del cAMP e **apertura della cftr** con secrezione di cloro e successivamente di sodio per una via paracellulare nel lume e **quindi diarrea acquosa**. Questo è il **meccanismo acquisito** e non genetico di **danno ed alterazione della funzione di cftr** che è **una gain of function**(aumento di funzione).

La regolazione di cAMP da parte della subunità catalitica della PKA(costituita da una subunità regolatrice e due subunità catalitiche) avviene in questo mod: il cAMP si lega alla subunità regolatrice, ne modifica la conformazione in modo che le subunità catalitiche si distacchino e possano attivare, fosforilando una serie di substrati specifici.

MALATTIE CAUSATE DA ALTERAZIONI DI GENI CODIFICANTI PER TRASPORTATORI ABC ("ATP-BINDING CASSETTE") (DIAPO 34 LEZIONE 3.3):

Delle ATP Binding Cassette abbiamo visto vari tipi di patologie: la malattia di Tangeri, la citocolesterolemia accumulo di colesterolo e fitosteroli nei tessuti, la fibrosi cistica.

Vi è infine una patologia dovuta ad una **mutazione di un gene** che si chiama **BCC8** che è in grado di determinare importanti **alterazioni della glicemia**. Questo gene codificala sintesi di una proteina che è noto come **recettore per la sulfunilurea**(è un importante farmaco che si usa nel trattamento del diabete di tipo 2).

SECREZIONE DI INSULINA DA PARTE DELLE CELLULE BETA-PANCREATICHE:

Dobbiamo considerare il prodotto del gene ABCC8 che è SUR1(sulfunilurea receptor) e il canale per il potassio, che è circondato dalle bc protein. Alterazioni della struttura di queste SUR protein da parte di farmaci o da parte di alterazioni genetiche **modificano la funzione di questo canale per il potassio**.

Questo canale per il potassio è importante per la secrezione di insulina perché quando noi consumiamo un pasto, aumenta la glicemia e il **glucosio che circola nel sangue viene assunto da diversi tipi di cellule**; questa assunzione può essere **regolata o non regolata**.

Vi sono alcune cellule in cui il trasporto di glucosio **non è regolato**, ovvero i trasportatori per il glucosio espressi da queste cellule **non sono saturabili** per cui il glucosio continua ad entrare in queste cellule anche con livelli di glicemia altissimi. I distretti che non hanno un sistema di trasporto saturabile del glucosio sono il **sistema nervoso centrale**, che ha bisogno di una enorme quantità di glucosio per svolgere le sue funzioni, e **le cellule beta-pancreatiche** in cui la quantità di glucosio che entra all'interno delle cellule serve per graduare il rilascio di insulina. Allora il glucosio che entra nelle cellule beta-pancreatiche viene utilizzato

per la sintesi di ATP.Quindi, **maggiore glucosio, maggiore la sintesi di ATP** e quindi un **maggiore rapporto ATP/ADP** si ha questo fenomeno di **chiusura del canale per il potassio** che determina **un aumento delle cariche positive**(perchè il potassio è carico positivamente)che determina un fenomeno di **depolarizzazione della membrana plasmatica**. Sulla membrana delle cellule beta-pancreatiche ci sono dei **canali per il calcio** che sono dei VOC(Voltage- operated calcium channels)(presenti ad esempio anche nella muscolatura cardiaca che si aprono quando c'è un evento di depolarizzazione). Questo **ingresso di calcio** è un evento centrale per mediare la fusione di vescicole contenenti una particolare molecola con la membrana plasmatica e il rilascio del suo contenuto è strettamente dipendente dalla concentrazione di calcio citoplasmatico; per cui quando aumenta il calcio intraplasmatico attraverso **questa interazione tra v-Snare t-Snare**(*trattata in lezioni precedenti slide 8 lezione 3.1)* si ha la fusione delle vescicole con la membrana e il **rilascio, in questo caso, dell'ormone dell'insulina**.

Ovviamente succede l'opposto quando siamo a digiuno e quindi i valori del glucosio sono bassi, il rapporto ATP/ADP si riduce e quindi i canali per il potassio rimangono aperti, uscendo cariche negative si ha iperpolarizzazione normalmente circa -70 mV e in questo caso quindi i canali per il calcio sono chiusi e non sono in grado di sentire modificazioni del voltaggio. Quindi i granuli contenenti insulina rimangono all'interno della cellula. Questo meccanismo rende queste cellule sensori molto efficaci della glicemia e quindi della secrezione poi di un ormone in grado di regolare il metabolismo glucidico, ma non solo.

SULFUNILUREA E DIABETE DI TIPO II:

Nonostante il diabete di tipo 2 nasca come diabete per definizione insulino indipendente, cioè che non ha bisogno di insuina anche perché spesso nelle prime fasi di sviluppo il diabete di tipo 2 è anche iperinsulinemico e c'è una quantità maggiore di insulina circolante, il diabete di tipo 2 evolve progressivamente verso una situazione in cui le cellule beta pancreatiche vanno incontro a dei processi genericamente regressivi per cui queste cellule hanno una ridotta capacità di secernere insulina. La sulfunilurea e dei suoi derivati sono utilizzati in quanto si legano con SUR e determinano una chiusura dei canali per il potassio, cioè determinano un fenomeno che è analogo a quello della iperglicemia e quindi favoriscono la depolarizzazione, l'aumento del calcio citosolico e il rilascio dell'insulina.

Argomento che verrà trattato con maggiore specificità nel corso di malattie del metabolismo: oltre alla disregolazione della secrezione dell'insulina vi sono altri meccanismi che sono dipendenti dall'utilizzazione del glucosio attraverso la via glicolitica, es dipendenti da segnali di altre molecole che inducono insulina, per esempio acidi grassi possono stimolare il rilascio di insulina, anche amminoacidi possono indurre il rilascio di insulina.

MODIFICAZIONI DEI SUR LOSS OF FUNCTION: (SLIDE 38.LEZIONE 3.2):

Ci sono delle modificazioni di Sur che comportano una loss of function, quindi la funzione del SUR è in qualche modo alterata. La conseguenza è che si ha uno **stato di chiusura dei canali per il potassio**, fenomeni di **depolarizzazione e apertura dei canali per il calcio con conseguente rilascio di insulina.** Queste situazioni sono rare ma possono portare a situazioni di **iperinsulinemia e quindi gravi crisi ipoglicemiche poiché l'insulina favorisce l'ingresso del glucosio in tutti i tessuti.**

MUTAZIONI GAIN OF FUNCTION:

Vi sono anche situazioni di gain of function che però non riguardano il SUR **ma riguardano il Kir6.2**. In questo caso **il canale per il potassio rimane aperto**, si ha una **iperpolarizzazione, una chiusura dei canali per il calcio** e **difetti di secrezione per l'insulina**. In questo caso abbiamo il classico **diabete neonatale** (con riduzione di insulino dipendente) in cui però **non c'è** quel fenomeno caratteristico della stragrande maggioranza dei diabeti della prima infanzia che sono dovuti a meccanismi di **distruzione delle cellule beta pancreatiche** attraverso un meccanismo immune.

<u>LEZIONE 3.3: ALTERAZIONI DELLA MEMBRANA PLASMATICA</u>

ALTERAZIONI DELLA MEMBRANA PLASMATICA:

Comportano alterata espressione o funzione dei recettori di membrana. Questo tipo di patologia cellulare con importantissime ripercussioni in campo patologico può essere classificata schematicamente in due modi: (SLIDE 2 LEZ.3.3)

1. Innanzitutto può essere classificata considerando delle **alterazioni quantitative** dell'espressione dei recettori. L'espressione dei recettori può ovviamente alterare la funzione dello stesso in quanto il ligando che si deve legare con la cellula non trova un numero adeguato di recettori. Questa patologia può essere riassunta in difetti di espressione su **base genetica o acquisita**, in particolare per quanto riguarda i difetti di espressione su base genetica vedremo i difetti di espressione e di internalizzazione del recettore per le LDL.

Un altro gruppo di difetti riguardano **l'espressione per recettori adesivi**. Sono importanti in due eventi fisiopatologici determinanti che sono rappresentati da un aspetto del processo infiammatorio vale a dire il **reclutamento di cellule nel sangue al tessuto**, chiamato reclutamento leucocitari di cui vedremo **leLeukocyte Adhesion Deficiency Syndromes (LADs**) di cui esistono tre tipi diversi che comportano un difetto di adesione dei leucociti all'endotelio e un difettivo reclutamento.

Altre due patologie estremamente importanti in eventi adesivi sono alla base della funzione delle **piastrine**. Le piastrine sono essenziali per le funzioni emostatiche, cioè per la riparazione dei danni della parete vascolare, alterazioni di recettori adesivi sulle piastrine comportano una **diatesi emorragica, cioè una tendenza al sanguinamento**.

Poi vi sono anche difetti per l'espressione di recettori per ormoni(problematica specifica dell'endocrinologia)

1. Vi sono poi difetti di espressione che sono su **basi acquisita** di cui vedremo:

- Quella che è la patologia umana più diffusa: **ridotta espressione *LDL-receptor***per eccessivo **accumulo di colesterolo intracellulare** e questa alterazione è essenziale nella patogenesi dell'**aterosclerosi**.

- Ridotta espressione di recettori adrenergici nello **scompenso cardiaco;**

- Ridotta espressione di **molecole che regolano i processi endostatici sull'endotelio** nel corso delle risposte infiammatorie.

1. **3.** Infine vi sono una serie di esempi di **aumentata espressione,** per esempio tutti i leucociti sono in grado di modulare l'espressione di una serie di recettori e riscuotere una serie di risposte; le cellule endoteliali sono molto importanti nella modulazione di questi recettori .

Infine cellule proliferanti endoplastiche esprimono maggiori quantità di recettori per fattori di crescita.

Queste **alterazioni sono quantitative** però vi sono **anche alterazioni funzionali**, **qualitative** in cui indipendentemente dalla quantità di espressione c'è un **difetto di espressione** che comporta guadagno o perdita di funzione e **sia meccanismi genetici che acquisiti possono comportare alterazioni nella capacità di un recettore di trasdurre un segnale all'interno della cellula.**

DIFETTI DI ESPRESSIONE RECETTORE PER LDL: (SLIDE 7 LEZIONE3.3)

L'immagine riassume la struttura, il circolo e il destino di una serie di microproteine come i chilomicroni che vengono formati dall'enterocita, rilasciati in circolo e modificati; rimangono questi residui di chilomicroni che entrano attraverso diversi tipi di recettore(per esempio gli LRP)nel fegato. Il fegato secerne VLDL che verranno modificatedalla lipoprotein lipasi a costituire LDL che vengono internalizzate attraverso un recettore specifico ovvero LDL-receptor.

(Si accenna alla presenza di molecole che regolano la capacità dell'LDLreceptor di internalizzare l'LDL). Vi è una proteina che appunto facilita l'internalizzazione e la formazione di vescicole endocitarie; c'è invece una proteina PCSK9 che invece svolge un ruolo negativo perché favorisce il targeting, la destinazione del recettore per LDL a un comparto vescicolare dove il recettore viene distrutto. La conseguenza è una progressiva perdita di espressione di questo recettore sulla superficie.

Queste alterazioni recettoriali sono alla base di alcune patologie genetiche che sono caratterizzate dall'ipercolesterolemia.

IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE:

La prima più classica, più importante è l'**ipercolesterolemia familiare**. E' una malattia autosomica dominante.

Nell'eterozigote (1/500) valori di 300 mg/dl LDL-colesterolo (il cut off per la normalità oggi è stato posto attorno a 200 mg/dl). Nell'omozigote, quando entrambi gli alleli sono alterati (1/1.000.000) si arriva a valori superiori a 650 mg/dl LDL-colesterolo.

In questa patologia il **gene mutato è quello che codifica per il recettore per le LDL**. Questa malattia è molto importante nella storia **dell'aterosclerosi** (lesione complessa dovuta alla formazione di placche aterosclerotiche su vasi arteriosi di medio e di grosso calibro) e l'importanza dello studio di questa malattia è rappresentata dal fatto che negli omozigoti le lesioni aterosclerotiche sono talmente precoci che possono comportare mortalità per infarto del miocardio o danni cerebrovascolari in età prepubere(10-11 anni di vita).

Questa malattia ha stabilito il principio fondamentale che valori estremamente elevati di LDL e colesterolo sono di per sé causa di aterosclerosi. E' accettato largamente che l'aterosclerosi è una malattia multifattoriale in cui contano la pressione arteriosa, le abitudini di vita, il fumo di sigaretta, l'attività fisica, il fatto di essere maschi o femmine,ecc. Però al di sopra di un certo valore di LDL e colesterolo tutti questi fattori "spariscono", perché un bambino di 10 anni non è iperteso, si presume che non fumi, e questi valori di LDL e colesterolo sono **sufficienti** a determinare lo sviluppo molto precoce della lesione aterosclerotica. Questo è quello che è stato definito **il principo di Koch per l'aterosclerosi** cioè che una causa ben precisa è in grado da sola indipendentemente dagli altri fattori di rischio di determinare aterosclerosi.

Ovviamente la multifattorialità della lesione resta comunque valida perché i soggetti che hanno questi valori di LDL e colesterolo sono 1/1000000, quindi tutti gli altri che sviluppano aterosclerosi hanno valori sicuramente inferiori a 300 mg/dl(valori dell'eterozigote)e però hanno anche i fattori di rischio(fumano, non si muovono, sono obesi, ecc)

DIFETTI FAMIGLIARI DI APO B-100:

La seconda patologia, che è meno grave dal punto di vista delle conseguenze, sono dei **difetti familiari di APO B-100.** APO B-100 è il ligando per i recettori per le LDL e quindi abbiamo una patologia genetica non dovuta ad alterazione del recettore bensì ad **alterazioni del ligando**. Se il recettore è poco in grado di legare il ligando, per esempio a causa dell'alterazione di affinità di legame per il ligando, la conseguenza è come se non ci fosse il recettore.

IPERCOLESTEROLEMIA AUTOSOMICA RECESSIVA:

La terza situazione (*si tratta di **ipercolesterolemia autosomica recessiva)*** ci riporta ad una proteina scoperta successivamente. Il gene che codifica per questa proteina regola **l'efficacia dell'internalizzazione del complesso ligando-recettore**. E' rarissima - omozigote (<1/10.000.000)- però è servita a comprendere che il recettore per le LDL è in qualche modo aiutato ad internalizzare il suo ligando(l'LDL).

Tabella slide 6 lezione 3.4, classifica le iperlipoproteinemie in modo moderno-classicamente sono ancora classificate in 5 tipi che verranno fatte nel corso di malattie del metabolismo-nella tabella si possono comunque vedere alcune delle patologie indicate dal prof.

RECETTORI DELLE LIPOPROTEINE:

Per comprendere il ruolo di recettori nelle patologie genetiche del metabolismo delle lipoproteine bisogna analizzare quali sono i recettori. Si tratta di una famiglia che è classificata in 3 gruppi:

1. Il primo gruppo, che è anche il primo dal punto di vista della scoperta, è quello che viene chiamato **LDL receptor**, questo è un recettore ubiquitario presente su tutte le cellule a parte i globuli rossi, i neutrofili ne hanno tracce, anche i leucociti ne hanno un po'. È un recettore che riconosce le apoproteine (un recettore, a parte che è un'eccezione, sono implicati in interazioni proteina-proteina quindi non possono riconoscere i lipidi della glicoproteina, ma riconoscono l'apoproteina). Questo recettore **riconosce sia l'APO B100 che l'APO E**, quindi riconosce tutte le lipoproteine che hanno APO E *(rivedi tabella con espressione delle apolipoproteine mostrata in lezioni precedenti dal prof)*e riconosce appunto anche lipoproteine che hanno APO B100. Tra queste lipoproteine che hanno APO B100 in particolare **c'è non soltanto la VLDL ma anche la LDL**.

La caratteristica fondamentale di questo recettore è che **la sua espressione è regolata**.

REGOLAZIONE LDL RECEPTOR:

È un meccanismo di regolazione molto semplice basato sul fatto che **maggiore è la quantità intracellulare di colesterolo nelle cellule del fegato e nei tessuti periferici minore è l'espressione del recettore**.

Il colesterolo fa male non perché sia una molecola tossica (anche se come vedremo i cristalli di colesterolo possono ridurre una serie di funzioni cellulari) ma perché **maggiore è la quantità di colesterolo che si accumula nei tessuti periferici e nel fegato minore è l'espressione del recettore per le LDL**. Questo comporta il fatto che essendoci pochi recettori le lipoproteine che hanno solo APO B100, cioè le LDL, **rimane in circolo per un tempo più lungo** e quindi progressivamente tra l'altro va incontro ad una serie di **modificazioni** che comportano il suo **accumulo nell'endotelio** vascolare dei vasi di medio e grosso calibro e l'innesco di un processo **aterosclerotico.** Quindi esiste un **circolo vizioso** per cui queste LDL, che sono le LDL che hanno una quota maggiore di colesterolo accumulato nel core, rimangono in circolo per tempi più lunghi man mano che l'accumulo di colesterolo nei tessuti aumenta.

1. Il secondo gruppo di recettori (questo è molto complesso, implicato in realtà in moltissimi fenomeni) è stato chiamato **LRP**- acronimo che sta per **LDL receptor Related Protein**- cioè una proteina che ha una struttura simile alla LDL receptor e **che riconosce tutte le lipoproteine che hanno APO E** . Allora riguardando la distribuzione dell'espressione delle apolipoproteine nelle diverse lipoproteine si noterà che **tutte le lipoproteine hanno APO E escluse le LDL**.

Quindi **per le LDL c'è un solo recettore, per tutte le altre lipoproteine vi sono due recettori**. Questo spiega il fatto che per esempio nell'ipercolesterolemia familiare in cui manca questo recettore le uniche lipoproteine che aumentano sono le LDL perché le altre entrano attraverso questo recettore accessorio.

La caratteristica di questo recettore è che oltre ad essere **ubiquitario**, **non è regolato** nella sua espressione, nel senso che **indipendentemente dall' accumulo di colesterolo intracellulare;** l'espressione di questo recettore rimane elevata sia nel fegato che nei tessuti periferici e quindi consente **un'efficiente rimozione di lipoproteine circolanti.**

1. La terza ancora più complicata famiglia di recettori per le lipoproteine sono quelli che vengono chiamati **Scavenger Receptors** (scavenger vuol dire spazzino). Questo termine deriva dal fatto che questi recettori venivano individuati come **recettori non ubiquitari ma selettivamente espressi su cellule di tipo monocita-macrofagico** (cellule monocitico macrofagiche sono le cellule che maggiormente si accumulano nella lesione aterosclerotica)

Il nome che venne dato a questo recettore, segue una sorta di interpretazione funzionale (che può essere verificata ma non del tutto vera) nel senso che per non poco tempo questo gruppo di recettori venne considerato svolgere un ruolo protettivo nello sviluppo della lesione aterosclerotica. Le cellule monocitiche macrofagiche vennero infatti interpretate come cellule richiamate nella sede di accumulo di lipoproteine, che internalizzavano queste lipoproteine e poi potevano **ripulire** l'intima arteriosa rimuovendo le lipoproteine accumulate.

Vi sono diversi aspetti di questo recettore che val la pena far riferimento. Innanzitutto che questo recettore non riconosce le LDL native, cioè quelle che troviamo nel plasma e che troviamo per tempi relativamente brevi nell'intravascolare, ma **riconoscono le LDL modificate** e in particolare riconoscono le LDL modificate **da processi di tipo ossidativo**, cioè LDL in cui i lipidi, in particolare gli acidi grassi, sono andati incontro a quel processo di perossidazione lipidica mediata per esempio dai radicali dell'ossigeno.

La caratteristica di questi recettori è che l'espressione **non è regolata**, tramite questi recettori le cellule macrofagiche -anche in vitro- internalizzano lipoproteine fino a "morirne", nel senso che poi questo accumulo di lipidi può comportare a dei danni. In questo sta anche il concetto di scavenger receptor, se è un recettore che serve a portar via qualcosa non ha nessun senso che sia modulato ma deve funzionare e internalizzare lipoproteine.

SCAVENGER RECEPTOR DI TIPO A:

L'aspetto più recente nello studio di questa classe di recettori è rappresentato dal fatto che questi recettori riconoscono non soltanto le LDL modificate ma riconoscono un **ampio gruppo di ligandi che rientrano nei cosiddetti Pamps e Damps**, ovvero molecole che sono Patogenes Aassociated Molecular Patterns, cioè molecole presenti sulla superficie di microrganismi o sono per esempio una forma particolare di Damps -Damage Associated Molecular Patterns-cioè molecole che per esempio si trovano sulla superficie di cellule che stanno andando incontro ad un processo apoptotico o appunto a frammenti di queste cellule che sono i corpi apoptotici. Questi scavenger receptors sono stati poi riclassificati come scavenger receptor di **tipo A**, che hanno quindi le caratteristiche di espressione selettiva, non regolata, riconoscono LDL modificate

SCAVENGER RECEPTOR DI TIPO B:

Sono sottoclassificati in due gruppi: scavengers receptor di **tipo B1**, sono particolarmente espressi in **fegato e nei tessuti sintetizzanti gli ormoni steroidei**, riconoscono anch'essi(altrimenti non rientrerebbero nel gruppo degli scavenger receptor) le **LDL modificate** ma ad oggi sono considerati come i **recettori elettivi per le HDL**. Questo trasporto inverso di colesterolo consente la veicolazione di colesterolo che le HDL hanno acquisito dai tessuti periferici, nel fegato oppure in tessuti che consumano il colesterolo, in particolare tessuti che sintetizzano ormoni steroidei che utilizzano colesterolo per sintetizzare queste molecole.

Gli scavenger receptor di **tipo B2** sono invece molto più simili agli scavenger receptor A, cioè sono recettori la cui espressione per esempio su monociti macrofagi o cellule endoteliali e li rende simili anche da un punto di vista funzionale agli scavenger

receptor A, sono infatti i recettori monicitici-macrofagici e anche delle cellule endoteliali e adipociti, che **internalizzano LDL modificate**.

Questi recettori sono anch' essi considerabili **non regolati** nella loro espressione quindi **tutto il gruppo degli scavenger receptor non è regolato**.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 16/10/2012

16/10/2012

SBOBINATORE: Corradin Sofia

Prof. Berton

LEZIONE 3.3: ALTERAZIONI DELLA MEMBRANA PLASMATICA

ASPETTI CENTRALI DEI RECETTORI PER LE LIPOPROTEINE

LDL RECEPTOR (slide 10-11 lez. 3.3)

- E' stato il primo ad essere scoperto
- Presenta diversi domini "*lezione disturbata NdR"*
- Riconosce con i suoi siti di legame ligandi specifici come l'APO-B100 e l'APO-E
- Possiamo considerarlo un recettore nutritivo nel senso che internalizza strutture lipoproteiche nelle quali si trova una grossa componente lipidica che viene utilizzata per il metabolismo della cellula.

Modalità di funzionamento:

1) Un aspetto centrale di questo recettore, che è stato caratterizzato in gran dettaglio, sta nel fatto che va incontro ad un fenomeno di internalizzazione (il fenomeno generale viene definito endocitosi mediata da recettori,RME). In questo interessante ed importante evento biologico si verifica che il recettore si concentra in regioni specializzate della membrana plasmatica che vengono anche chiamate "coated pit", la cui traduzione letterale è "pozzetti ricoperti" perchè ad un'osservazione al microscopio elettronico in questo dominio della membrana plasmatica si nota un ispessimento dovuto al fatto che sulla faccia interna della membrana c'è una specie di cesto costituito da un aggregato della proteina clatrina.

2) Successivamente all'interazione con il ligando, il complesso LDL-ligando viene internalizzato e si crea un comparto endosomiale; questo comparto è anche arricchito da una pompa protonica che trasferisce protoni dal citosol all'interno dell'endosoma acidificando questo microambiente. Le interazione ligando-recettore se studiate in vitro in diverse condizioni sperimentali sono reversibilizzate ad un ph inferiore a 6.5.

3) Il ligando in questo microambiente, successivamente all'acidificazione, si distacca dal recettore e si verifica un importantissimo fenomeno che viene definito riciclaggio del recettore ovvero: i recettori vengono segregati in un altro comparto endosomiale che si stacca da questi endosomi originali e vengono riportati alla membrana plasmatica. Questo meccanismo è molto raffinato e serve a risparmiare recettori che vengono internalizzati, non costringendo la cellula a risintetizzarli. Questo riciclaggio, nel caso delle LDL, è stato visto essere regolato negativamente dalla proteina PKCS9 che inibisce il riciclaggio e favorisce la distruzione del recettore.

4) Gli endosomi contenenti il ligando si fondono con i lisosomi a formare quello che viene definito lisosoma secondario. I lisosomi possiedono un ph acido quindi degradano tutto ciò che vi si trova all'interno al costituente essenziale; degradano proteine, lipidi e glucidi e anche gli eventuali recettori che sono rimasti intrappolati nell'endosoma (i meccanismi di recicling infatti non hanno mai un'efficienza del 100%). → Qualsiasi fenomeno di internalizzazione comporta comunque una degradazione

di una parte dei recettori. Quindi maggiore è l'internalizzazione dei recettori attraverso questo meccanismo, maggiore è la perdita progressiva di questi recettori sulla membrana plasmatica perché il riciclaggio non ce la fa a sopperire a questo costante processo di internalizzazione e successiva degradazione. Il mantenimento dell'omeostasi in termini di espressione di un recettore di membrana dipende anche dai processi di neo-sintesi della cellula attraverso la trascrizione del gene che codifica per il recettore. Questo processo mediato dagli enzimi lisosomiali consente di liberare colesterolo libero che viene poi estruso dall'endosoma, vengono clivate le proteine, gli amminoacidi,…

5) Un aspetto rilevante è il fatto che il **colesterolo** estruso dal lisosoma , attraverso un trasportatore presente sulla membrana del lisosoma secondario, media tre importanti effetti:

- il colesterolo è un inibitore allosterico dei meccanismi di neo-sintesi del colesterolo stesso (vedere biochimica perché è un meccanismo molto complesso in cui sono implicati almeno 30 enzimi e per il quale sono stati assegnati vari premi Nobel). In questa neo-sintesi c'è un enzima critico che è HMG-CoA reduttasi, il primo enzima che entra in gioco nella sintesi del colesterolo a partire dall'acetil-CoA; esso è inibito allostericamente dal colesterolo. → Più colesterolo intracellulare c'è minore è la neo-sintesi del colesterolo. Questa inibizione non ha un'efficacia del 100% (ci sono tutta una serie di fattori in parte ancora non noti) infatti la neo-sintesi del colesterolo è molto variabile nei diversi individui e vari fattori sono in grado di condizionare l'efficacia del colesterolo nel bloccare la biosintesi.
- il colesterolo attiva un enzima che lo esterifica: una parte del colesterolo all'interno del citosol è sotto forma esterificata, un'altra parte del colesterolo è invece libero e va a finire nelle membrane biologiche (sia plasmatica che del reticolo endoplasmatico - Il colesterolo nella membrana plasmatica svolge un ruolo essenziale, soprattutto conferisce resistenza a insulti di diversa natura come una forza meccanica; non a caso la membrana del muscolo scheletrico è estremamente ricca di colesterolo che, dandole resistenza, la protegge dallo stress meccanico dovuto alla contrazione muscolare. Se si effettua una deplezione del colesterolo dalla membrana essa diventa fragile portandola addirittura alla rottura e questo avviene nel contesto di terapie).
- Esiste una relazione diretta tra colesterolo e trascrizione del gene che codifica per il recettore delle LDL. → Uno dei dogmi di questo aspetto della biopatologia: maggiore è l'accumulo intracellulare del colesterolo minore è la trascrizione del gene che codifica per il recettore per le LDL.Questo fattore sta alla base di un circolo vizioso: più LDL circolanti ci sono, più vengono internalizzate. In una prima fase quindi si ha una perdita di espressione del recettore sulla superficie perché viene internalizzati insieme al colesterolo, mentre in una seconda fase, la maggiore concentrazione di colesterolo intracellulare sopprime la trascrizione del gene per il recettore delle LDL e progressivamente la quantità del recettore sulla superficie della cellula diminuisce. Se si ha un aumento del colesterolo intracellulare si ha, come conseguenza della riduzione del numero dei recettori sulla superficie, un aumento delle LDL circolanti e quindi una maggiore probabilità che queste rimangano in circolo più a lungo andando incontro ad una serie di modificazioni e finiscano poi per essere adsorbite nell'intima dei vasi arteriosi di medio e basso calibro.

Regolazione della trascrizione del recettore:

Come fa il colesterolo a regolare un evento di trascrizione genica è rimasto misterioso per tanto tempo, in quanto era contro tutte le evidenze che dicevano che la trascrizione genica è regolata da una serie di proteine che reagiscono come fattori di trascrizione (possono trovarsi nel citosol oppure nel nucleo) che si legano a sequenze promotrici di una serie di geni favorendo la trascrizione dei geni stessi. Questa cosa però e stata successivamente chiarita e gli attori di questo complesso fenomeno sono una serie di proteine localizzate nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato di Golgi.

- Una di queste proteine è la proteina **SREBP** (Sterol regulatory element-binding protein), è una proteina che si lega a sequenze regolatorie di geni che sono regolati dalla quantità di steroli presenti all'interno della cellula. Questa proteina è normalmente ancorata alla membrana del reticolo endoplasmatico, attraversa due volte la sua membrana ed ha due domini che aggettano nel citosol e uno nel lume del RE. Uno dei due domini che aggettano nel citosol è in grado di interagire con il dominio di un' altra proteina che è stata chiamata **SCAP** (SREBP clivage activated protein), anch'essa localizzata nella membrana del reticolo endoplasmatico, che può interagire con SREBP in particolari condizioni.
- Un altro gruppo di molecole importanti (slide 14 lez. 3.3, ne viene indicato uno ma in realtà sono due) è rappresentato da una serie di **proteasi** che si trovano nell'**apparato di Golgi**.

SREBP ha quindi due domini che aggettano nel citosol uno dei quali è in grado di interagire con SCAP, l'altro ha una struttura a bHLH (basic helix-lool-helix domain) che è un dominio tipico di vari fattori di trascrizione. E' un dominio che per caratteristiche di carica positiva interagisce con il DNA e regola la trascrizione genica. Quindi questo dominio è potenzialmente in grado di regolare una serie di geni però, (slide 15 lez. 3.3) in condizioni normali, non entra nel nucleo e non si lega al DNA in quanto è ancorato alla membrana del reticolo endoplasmatico. La cosa interessante di questo complesso meccanismo di regolazione della trascrizione del gene per il recettore delle LDL è che esiste una regolazione dell'interazione tra SCAP e SREBP; in seguito all'interazione tra le due questo complesso di proteine si segrega in vescicole che raggiungono l'apparato di Golgi. Nell'apparato di Golgi vi sono due proteasi che scindono SREBP o nel lume dell'apparato di Golgi o in un sito che è vicino alla membrana dell'apparato di Golgi stesso e questo clivaggio libera il dominio della proteina (bHLH) che a questo punto può migrare nel nucleo, legarsi a sequenza regolatrici SRE (Sterol response elements) e dettare la trascrizione di una serie di geni. Tra questi geni non c'è soltanto quello del recettore per le LDL ma tutta una serie di geni che regolano la sintesi di enzimi implicati per esempio nel metabolismo lipidico. Cosa regola l'interazione tra SCAP e SREBP? Tale interazione è regolata dalla quantità di colesterolo localizzato nella membrana del reticolo endoplasmatico. Maggiore è la quantità di colesterolo, più sfavorita è questa interazione

tra SCAP e SREBP, quindi in questo caso SREBP rimane ancorato alla membrana del reticolo endoplasmatico quindi non può raggiungere il Golgi e il fattore di trascrizione non può essere liberato. Quando la quantità di colesterolo nella membrana del reticolo endoplasmatico diminuisce le due proteine interagiscono innescando questo processo. E' un meccanismo particolare in cui un lipide relativamente semplice come il colesterolo riesce a regolare diversi fenomeni come la trascrizione genica.

(slide 16 lez. 3.3) Le cellule sono stata marcate con anticorpo anti-SREBP fluorescente (nell'immagine in bianco e nero la fluorescenza si vede come un chiarore bianco). L'ingrandimento non permette di localizzare la fluorescenza; bisogna utilizzare un ingrandimento maggiore per individuare il reticolo endoplasmatico, comunque nella prima immagine si nota una fluorescenza intracitoplasmatica diffusa che definisce la presenza della proteina all'interno della cellula in un comparto vescicolare. Nella seconda immagine si vede il risultato che si ottiene se si pone la cellula in presenza di siero ricco di diverse cose tra cui lipoproteine; se si effettua la colorazione 24 ore dopo la rimozione del siero, si nota che queste cellule hanno iniziato ad usare colesterolo intracellulare, quindi la membrana del reticolo endoplasmatico si è impoverita di colesterolo e si è innescato il meccanismo di interazione SREBP-SCAP e la fluorescenza a questo punto è per gran parte nucleare perché il fattore di trascrizione si è spostato nella sede in cui funziona, cioè dove svolge il suo ruolo biologico.

Mutazioni del gene per il recettore (slide 17 lez. 3.3):

Il gene che codifica per il recettore delle LDL può andare incontro ad una serie di mutazioni che determinano l'alterazione di espressione e di funzione della proteina. Come nel caso della Fibrosi Cistica sono state definite diverse classi di mutazioni e queste hanno conseguenze diverse:

classe I: è quella classica e comporta un'alterazione strutturale del gene per cui si ha un'incapacità di trascrivere il gene e quindi di sintetizzare la proteina. E' la classe più frequente.

Classe II: il gene per il recettore viene trascritto, il recettore viene sintetizzato ma non va incontro alle modificazioni post traduzionali che sono importanti per la sua espressione sulla superficie e quindi rimane nel reticolo dove sostanzialmente non serve.

Classe III: mutazioni che alterano le interazioni con le lipoproteine, in particolare con APO-B100.

Classe IV: recettori che non si localizzano nelle coated- pit e rimangono sulla membrana plasmatica. In questo modo quindi non vengono endocitati.

classe V: questi recettori vengono internalizzati ma non vengono riciclati e quindi si ha una rapida deplezione di recettori sulla membrana plasmatica.

Le mutazioni del recettore delle LDL definiscono una malattia scoperta nel primo dopoguerra chiamata **ircolesterolemia familiare**. Si tratta di una malattia autosomica dominante in cui l'eterozigote ha livelli di colesterolo pari o superiori ai 300 mg/dl, l'omozigote valori anche doppi a questi. E' una malattia importante perché provoca lesioni aterosclerotiche precoci ed è stata utile per studiare tutta una serie di farmaci con l'obbiettivo di aumentare l'espressione del recettore per le LDL. → Più LDL circolanti nel plasma ci sono maggiore è la probabilità di avere un danno aterosclerotico quindi bisogna aumentare l'espressione del recettore per ridurre i livelli di LDL circolanti e ridurre il rischio di lesioni aterosclerotiche. Il bersaglio ideale per questo tipo di studi è l'eterozigote perché presenta un allele mutato e uno sano. Si è quindi cercato di far lavorare di più l'allele sano in termini di trascrizione per garantire una sufficiente espressione del recettore. Nel caso dell'omozigote non si può fare niente se non una terapia genica che funziona benissimo nel modello murino. E' stato infatti dimostrato come vettori virali che contengono il gene per i recettori delle LDL possono essere veicolati al fegato e, nei topi knock-out per il recettore, le cellule, che vengono transfettate con questo vettore virale, possono recuperare la loro funzionalità in termini di metabolismo lipidico; questo però non è ancora stato sperimentato sull'uomo.

Approcci per ridurre i livelli di colesterolo (slide 18-19 lez.3.3)
: Gli approcci per aumentare l'espressione del recettore sono finalizzati ad eliminare colesterolo dalle cellule dei tessuti sia periferici che del fegato. Se si riduce il colesterolo viene aumentata l'espressione del gene. Come facciamo a ridurre i livelli di colesterolo?

1. uno dei metodi usati in laboratorio ma che ora è andato un po' in disuso era basato sull'uso di resine, come la colestiramina, che avevano la capacità di legare i sali biliari che dal fegato raggiungevano l'intestino. (Premessa: i sali biliari sono una delle potenziali vie di eliminazione del colesterolo in quanto vengono sintetizzati nel fegato a partire dal colesterolo. L'unico problema è che siccome i sali biliari servono per il riassorbimento dei lipidi -formazione delle micelle- esiste un ciclo entero-epatico di riassorbimento dei sali biliari per cui circa il 95% dei sali biliari che raggiungono l'intestino vengono riassorbiti, per cui è un'eliminazione fittizia). La colestiramina legando sali biliari ne favorisce l'eliminazione con le feci e quindi impone al fegato di utilizzare una parte del colesterolo accumulato per risintetizzare sali biliari. Questo meccanismo riduce il livello di colesterolo di una percentuale relativamente bassa. Esiste anche un meccanismo di eliminazione diretta del colesterolo da parte del fegato nelle vie biliari che sfrutta i trasportatori della famiglia g5/g8, trasportatori del colesterolo localizzati nel canalicolo biliare, e questo

spiega perché vi sia una relazione tra stasi nelle vie biliari per alterazione della fluidità della bile e ipercolesterolemia, in quanto viene ridotta la capacità di eliminare il colesterolo.

2. il secondo fondamentale meccanismo di riduzione dei livelli di colesterolo intracellulare è quello basato sul blocco della neo-sintesi. La neo-sintesi è iniziata dall' enzima **HGM-CoA reduttasi** che è allostericamente inibito dal colesterolo e che è un bersaglio importante per l'azione delle **statine** che sono in grado di inibire efficacemente la neo-sintesi del colesterolo. E' stato dimostrato che il 60-70% di colesterolo dipende dalla neo-sintesi più che dalle abitudini alimentari. Questo spiega perché in molti casi soggetti che hanno una dieta particolarmente ricca di colesterolo possono avere una percentuale di colesterolo normale o relativamente bassa mentre altri possono averla molto alta pur avendo una dieta non ricca di colesterolo.

3. approccio farmacologico che prende in considerazione diverse sostanze, tra cui la più caratterizzata è l'acido nicotinico. L'acido nicotinico diminuisce la secrezione di VLDL e soprattutto aumenta la sintesi di HDL, importanti per rimuovere il colesterolo dalla periferia. Le HDL infatti, depletando la membrana plasmatica dei tessuti periferici di colesterolo, impongono alla cellula di utilizzare colesterolo accumulato per rimpiazzare quello perduto sulla membrana plasmatica.

I primi studi dimostrarono che l'associazione di questi farmaci in soggetti eterozigoti per l'ipercolesterolemia familiare faceva scendere il livello di colesterolo da 300 a meno di 200 mg/dl in alcune settimane, quindi dimostrò inequivocabilmente che questi approcci terapeutici erano molto importanti e soprattutto evidenziavano le **statine** come presidio terapeutico determinante per ridurre il livello di LDL. Durante questi studi si verificarono anche degli incidenti, per esempio alcune statine erano così efficaci da inibire la neo-sintesi del colesterolo che procuravano gravi conseguenze alle fibre del muscolo striato per cui nel momento in cui si verificavano diminuzioni troppo drastiche di colesterolo si osservavano eventi di rabdomiolisi (rottura della membrana plasmatica delle cellule del muscolo striato con rilascio del contenuto in circolo). Le statine che erano così efficaci da provocare questi gravi effetti collaterali vennero ritirate dal commercio. Alcune sono utilizzate ormai da decenni con effetti collaterali molto bassi.

4. l'ultima comparsa nel campo dei farmaci che controllano il pool di colesterolo nel nostro organismo è rappresentato da farmaci che sono stati identificati dopo la scoperta di un trasportatore per il colesterolo e steroli vegetali presente sulla membrana apicale delle cellule intestinali e questo farmaco riduce l'assorbimento del colesterolo. Questo farmaco bypassava tutti gli approcci utilizzati fino ad allora, nel senso che andava all'origine e doveva essere molto efficace nel ridurre la quantità di colesterolo presente nella dieta e, nel caso di abitudini alimentari scorrette, esso poteva di per sé bastare a ridurre la colesterolemia.

In realtà per molti motivi le statine non hanno perso terreno dopo la scoperta di questo farmaco in quanto si sono dimostrate più efficaci nel ridurre la quantità di LDL e inoltre possiedono effetti aggiuntivi; le statine sono considerate, ed in parte è stato anche dimostrato, in grado di interferire con il reclutamento di alcuni tipi di cellule, in particolare il reclutamento dei monociti alla placca aterosclerotica. Bloccando il reclutamento di queste cellule alla placca sarebbero dunque in grado di ridurre una componente importante nella evoluzione della placca riducendo la vulnerabilità della placca. Le placche vulnerabili, cioè quelle che vanno incontro ad una maggiore serie di complicanze, sono quelle più ricche di lipidi e di cellule. Affrontare dal punto di vista terapeutico la lesione aterosclerotica significa ridurre la quantità di LDL che vengono costantemente reclutate nell'intima vascolare ma anche ridurre la cellularità, quindi il reclutamento di cellule monocitarie nel contesto della placca.

Questa proteina, **PKCS9** (slide 20 lez. 3.3), inibisce i fenomeni di recicling del recettore per le LDL. Contro essa sono stati prodotti degli anticorpi (cosa ancora sperimentale e molto recente) che, veicolati dentro la cellula, sono in grado di aumentare l'efficienza del riciclaggio e quindi di ridurre i livelli di LDL circolanti. Questo è quindi un nuovo potenziale bersaglio terapeutico in quanto inibendo questa proteina si favorisce un efficiente riciclaggio del recettore.

LRP (LDL RECEPTOR RELATED PROTEIN) (slide 21 lez. 3.3)

Questo recettore ha una struttura molto simile al recettore per le LDL, non a caso viene chiamato così. Possiede diversi siti di legame (parti rosse della figura) per apoproteine contenenti lipoproteine, in particolare ha un'elevata affinità per APO-E . Quindi è un recettore per tutte le lipoproteine che contengono APO-E tranne che per le LDL che entrano nella cellula solo tramite LDL receptor o, nel caso in cui vadano incontro a processi di modificazione, più precisamente processi ossidativi, tramite scavenger receptor. In realtà questi recettori servono anche ad altre funzioni.

SCAVENGER RECEPTORS

Sono stati inizialmente caratterizzati come monociti acrofago specifici. anno una particolare struttura e in realtà sono codificati da 2 geni distinti e classificati in tipo 1 e tipo 2. (slide 23 lez. 3.3) Sono composti da 3 catene che costituiscono un alfa elica espressa sulla superficie di cellule come quelle macrofagiche che sono in grado di internalizzare attraverso questi recettori le lipoproteine. Il ligando per questi recettori però non è rappresentato da LDL native ma da LDL modificate.

Classificazione dei recettori scavenger: vengono oggi classificati in gruppo A e gruppo B. Recettori del gruppo B1 sono recettori per le HDL, mentre i recettori del gruppo B2 comprendono **CD36** che è un'importante molecola scavenger che è espressa nel leucocita, nelle piastrine, nelle cellule endoteliali e anche negli adipociti. CD36 è considerata un'importante molecola in grado di innescare quel processo infiammatorio che caratterizza la formazione della lesione aterosclerotica in quanto interagisce con altri recettori, come quelli che fanno parte dei pattern recognition receptor, per indurre il rilascio di citochine e chemochine da parte dei monociti che sono reclutati nell'intima vascolare.

Come si è arrivati alla scoperta di tale recettore: ci si chiese come mai gli omozigoti per **l'ipercolesterolemia familiare**, che non hanno espresso il recettore per le LDL, avessero lesioni aterosclerotiche sovrapponibili a quelle di qualsiasi altro individuo, caratterizzate da foam cells, ovvero cellule schiumose che si accumulano nell'intima e hanno internalizzato lipoproteine. Evidentemente doveva esserci un altro recettore in grado internalizzare le lipoproteine. Essendo queste cellule di origine monocitica-macrofagica e siccome i monociti e i macrofagi sono cellule dotate di un'intensa attività fagocitaria, alcuni pensarono che le lipoproteine internalizzate da queste cellule nell'intima vascolare entrassero nella cellula per un meccanismo di default, cioè con un'endocitosi non specifica. Invece venne successivamente ipotizzata la presenza di un recettore specifico alternativo a quello per le LDL classico. I primi esperimenti furono frustranti in quanto se in vitro si forniscono LDL native ai macrofagi l'internalizzazione di queste all'interno della cellula è relativamente bassa. Da lì partirono una serie di osservazioni: se si lasciavano le LDL per qualche giorno esse subivano delle modificazioni che le rendevano in grado di essere internalizzate all'interno delle cellule macrofagiche. Quindi emerse progressivamente il concetto che i processi ossidativi a cui vanno incontro le lipoproteine, che sono facilitate dall'essere strutture lipidiche, sono essenziali nel modificare le caratteristiche fisico-chimiche dell'APO-B100 e questa modificazione è determinante nel renderle internalizzabili dagli scavenger receptor. Un aspetto essenziale della perossidazione lipidica, quindi delle modificazioni degli acidi grassi, è rappresentata dalla loro scomposizione e dalla formazione di gruppi altamente reattivi che sono delle aldeidi; tali aldeidi si legano ai gruppi NH2 liberi delle proteine e, in questo modo, ne modificano le caratteristiche chimico-fisiche, soprattutto di CARD. Questo legame di aldeidi all'APO-B100 fa in modo che l' APO-B100 modificata, presente sulle LDL ossidate, sia riconosciuta dallo scavenger receptor. Progressivamente emerse il concetto che gli scavenger receptor sembravano riconoscere anche altri tipi di molecole, in particolare alcuni componenti superficiali di microrganismi (lipopolisaccaridi dei gram – , acidi lipoteicoici, pattern sulla superficie di gram – e + e componenti superficiali dei corpi apoptotici). Questo è stato importante in quanto ha spostato gli studi sull'aterosclerosi verso l'idea di considerare, per alcune caratteristiche comuni, gli scavenger receptor come facenti parte del gruppo dei pattern recognition receptor (recettori che riconoscono componenti della superficie dei microrganismi che sono presenti sulla superficie di cellule della difesa innata), e quindi di considerare la lesione aterosclerotica come una sorta di "errore biologico". "Errore biologico" in quanto, nonostante questi recettori si siano evoluti nel contesto delle difese biologiche e nel riconoscimento dei patogeni, ad un certo momento della storia evolutiva dell'uomo hanno incontrato un altro ligando: le LDL ossidate. L'ipercolesterolemia è un avvenimento molto recente nella storia dell'uomo nel senso che l'assunzione di grosse quantità di alimenti, la maggior parte dei quali ricchi di colesterolo, non ha attraversato il percorso evolutivo della specie e i migliaia di anni che la caratterizzano. Quindi questo è un aspetto che è emerso successivamente e che ha enfatizzato la componente infiammatoria della lesione aterosclerotica. I recettori scavenger riconoscono queste lipoproteine che sono andate incontro a processi ossidativi e questo riconoscimento è "non virtuoso" perché i recettori scavenger sono recettori segnalanti, segnalano per la trascrizione di una serie di geni pro infiammatori, per la generazione di radicali tossici dell'ossigeno (un altro componente di questo circuito vizioso in cui l'internalizzazione delle lipoproteine ossidate genera radicali dell'ossigeno che ulteriormente modificano le lipoproteine intrappolate nell'intima vascolare). L'enfasi sui processi ossidativi delle lipoproteine come ligandi degli scavenger receptors ha spostato l'attenzione nella complessa patogenesi della placca aterosclerotica su i processi ossidativi come fattori di patologia, cioè alcuni sono fortemente convinti del fatto che se le LDL restassero in forma nativa invece che in forma ossidata non sarebbero in grado di indurre una lesione aterosclerotica e sarebbe proprio il processo ossidativo ad essere responsabile di questo fenomeno. Anche l'ossidazione delle lipoproteine è un aspetto della relazione dell'uomo con l'ambiente in un particolare momento della sua storia, che comporta il fatto che un eccesso di fenomeni ossidativi può causare la comparsa di questa patologia. L'interazione tra gli scavenger receptor e i lipidi modificati di origine esogena, come per esempio alcuni componenti presenti sulla superficie di microrganismi (es. streptococco) oppure lipidi modificati presenti sulle cellule che sono andate incontro a processi apoptotici può portare all'attivazione del macrofago. (Nei confronti delle lipoproteine ossidate potrebbero essere messe in atto delle strategie di tipo vaccinale, cioè indurre la formazione di anticorpi che legandosi a queste lipoproteine ossidate possano competere con l'interazione di queste e lo scavenger receptor). Le LDL ossidate sono il ligando per gli scavenger receptors e sono responsabili della formazione di quelle che sono chiamate foam cells (cellule schiumose) , sono cellule di origine monocitica che sono migrate nell'intima vascolare e che vanno incontro a diversi processi differenziativi e accumulano grosse quantità di LDL ossidate e grosse quantità di colesterolo. (slide 27 lez. 3.3)

Queste cellule finiscono per andare incontro a processi apoptotici, vengono stimolate dalle lipoproteine ossidate, quindi mantengono, innescano ed amplificano un pathway di tipo infiammatorio nel senso che:

- sia i recettori per le LDL ossidate sia gli scavenger receptor A e B, in particolare CD36, stimolano la trascrizione di una serie di geni pro infiammatori
- inoltre ci sono nuovi aspetti di questa problematica rappresentati dal fatto che la presenza di cristalli di colesterolo che si formano nei macrofagi sono stati visti essere attivatori di dell'inflammosoma e che anche attraverso la formazione dell'inflammosoma componenti delle lipoproteine ossidate internalizzate sono in grado di stimolare il macrofago a produrre molecole pro infiammatorie.
- nel processo di modificazione delle lipoproteine LDL che è importante nell'interazione con i recettori scavenger è stato dimostrato alcuni anni fa esserci non solo un processo di ossidazione ma anche altri fenomeni come per esempio la carbamilazione (slide 28 lez. 3.3). La carbamilazione è un complesso processo innescato fondamentalmente

dall'assunzione di tiocianati che vengono generati in particolare dalla combustione della carta nel fumo di sigaretta (link molecolare tra l'abitudine al fumo e l'aumentato rischio di lesione aterosclerotica: il fumo favorisce la formazione dei tiocianati che porta alla carbamilazione dell'APO-B100 e quindi la formazione delle foam cells). Ancora una volta le modificazioni di lipoproteine, che sono adsorbite all'intima vascolare, da parte di una serie di enzimi o di processi come la carbamilazione, hanno come bersaglio APO-B100 che diventa il ligando dello scavenger receptor A e di CD16; questo determina la formazione delle foam cells e innesca una serie di risposte pro infiammatorie nelle cellule monocitarie migrate dal sangue nell'interstizio.

SR-B1: recettore che forma un particolare tipo di loop, con parti terminali intracellulari. Oggi viene considerato un recettore elettivo per le HDL, consente l'adsorbimento delle HDL alla superficie delle cellule e, in questo contesto, è favorito il passaggio di colesterolo alla struttura delle HDL che poi lo esterificano e lo trasportano in determinati distretti corporei, compreso il fegato, dove lo SR-B1 internalizza le HDL. I componenti delle HDL vengono degradati e una quota di colesterolo può essere eliminata dal fegato attraverso trasportatori g5/g8 delle vie biliari. (slide 31 lez. 3.3)

LEZIONE 4.1: DIFETTI DI ESPRESSIONE DEI RECETTORI ADESIVI

Alcune patologie molto caratteristiche sono:

- Leukocyte Athesion Deficiency Syndrome LADS --> riguarda i leucociti

- Sindrome di Bernard-Soulier --> riguarda le piastrine

- Tromboastenia di Glanzmann --> riguarda le piastrine

Tipi e struttura dei recettori adesivi: (slide 2 lez. 4.1)

- **Selectine** : molecole espresse dall'endotelio e dalle piastrine, sono le uniche molecole adesive ad essere implicate nelle interazioni proteina-polisaccaride perché sono delle lectine-like protein, ovvero delle proteine simili ad una proteina vegetale che è la lectina, che riconoscono particolari residui polisaccaridici. Questi residui polisaccaridici sono nel contesto delle glicoproteine glicosilate ma la parte che viene riconosciuta è quella polisaccaridica.

- **Integrine** : eterodimeri costituiti da una catena α ed una β. Riconoscono diverse cose tra cui proteine della matrice extracellulare.

- **Ig-CAMs**: fanno parte della superfamiglia delle immunoglobuline perché presentano diversi domini Ig (perché originariamente identificati nelle Ig) che sono sequenze di un centinaio di aa, alle estremità ci sono delle cisteine che mediano la formazione di ponti disolfuro. Sono espresse da diversi tipi di cellule come quelle endoteliali e nervose in cui mediano diverse interazioni.

- **caderine** : importanti nelle interazioni tra cellule epiteliali, ma non solo. Sono molecole che, in modo calcio-dipendente, interagiscono con recettori simili, cioè con altre caderine espresse sulla superficie di cellule adiacenti formando la struttura delle giunzioni aderenti (strutture importanti per l'organizzazione dei tessuti). Queste molecole hanno la capacità di trasdurre segnali, capacità implicata in alcune modificazioni del comportamento di alcune cellule, in particolare di quelle neoplastiche.

INTEGRINE (slide 3 lez. 4.1) :

- costituiscono la classe più ampia di molecole adesive
- sono eterodimeri composti da una catena α ed una β
- i binding sites per i ligandi riconosciuti da queste molecole richiedono l'interazione tra la catena α e la β
- vengono classificate sulla base della struttura della catena β in 8 famiglie (da 1β ad 8β) e ciascuna può interagire con determinati tipi di catena α

Si pensava che le catene α fossero strettamente monogame ma in realtà non lo sono anzi, possono associarsi a diverse catene β. a specificità di legame è conferita soprattutto dalla catena α che detta l'interazione con specifiche molecole:

- la famiglia **β2** è quella delle integrine leucocitarie, cioè che sono espresse selettivamente sui leucociti. Possono essere associate a diverse catene α, le interazioni più importanti sono con αM e αL
- la famiglia **β3** svolge una funzione importante nell'emostasi piastrinica, in particolare l'eterodimero α2B β3 è espresso selettivamente sulle piastrine
- le **β1** (più di 9 membri) sono ubiquitarie, ma non proprio tutti i membri sono espressi in tutte le cellule
- **β7** sono leucocitarie
- **β4** sono epiteliali

Ligandi (slide 6 lez. 4.1) :

1. un gruppo di integrine, in particolare αV ma anche α5, α8 e α2B β3 , sono i cosiddetti **recettori RGD** che riconoscono specifiche sequenze aminoacidiche arginina-glicina-acido aspartico che sono presenti prevalentemente in proteine della matrice extracellulare come fibronectina o vibronectina oppure in alcune proteine circolanti nel plasma che però possono legarsi alla matrice extracellulare come per esempio il fattore di Von Willebrand o il fibrinogeno. (Questi ligandi possono essere riconosciuti da diverse integrine che sono in grado di riconoscere questa sequenza).
2. **recettori per il collagene**, sono soprattutto membri della famiglia β1, sono implicati nell'interazione tra diversi tipi di cellule, come le piastrine, con la componente essenziale della matrice extracellulare, altre riconoscono proteine della lamina basale come la laminina (α6 β4 in particolare).
3. ligandi specifici per le integrine **β 2** . Queste integrine possono riconoscere dei contro-recettori cellulari espressi sulle cellule endoteliali come **ICAMs,VCAM, JAMs.** Nel caso dell'α M sono in grado di riconoscere diverse componenti plasmatiche come derivati del complemento oppure componenti superficiali dei microrganismi. (In altre parole, αM β2 è una sorta di pattern recognition receptor che può legare componenti superficiali di microrganismi o frammenti del complemento che vengono depositati sulla supergicie id microrganismi. (In altre parole, αM β2 è una sorta di pattern recognition receptor che può legare componenti superficiali di microrganismi o frammenti del complemento che vengono depositati sulla superficie dei microrganismi. Questo è direttamente correlato al fatto che l'espressione delle αM β2 è l'imitata alle cellule dell'immunità innata. E' un marker di cellule fagocitarie, nel senso che è espresso su neutrofili, eosinofili, monociti e macrofagi mentre non è espresso sulla cellula linfocitaria, ovvero sulle cellule delle difese adattative. E' uno dei recettori implicato nel fenomeno di opsonizzazione, in cui la fagocitosi di certi microrganismi viene facilitata dal deposito sulla superficie di frammenti del complemento).

   Aspetto centrale: la capacità di legame delle integrine viene regolata; questa regolazione è stata studiata in particolare nel contesto delle integrine β2 e β3

Meccanismo di regolazione inside-out (slide 7 lez. 4.1)

L'adesività dell'integrina viene regolata mediante un inside-out signaling: la cellula deve essere stimolata attraverso recettori che riconoscono anche diverse classi di agonisti. Per cui deve verificarsi una modifica inside, cioè dentro alla cellula, perché possa avvenire un'altra modificazione outside, ovvero all'esterno: questa modifica è la capacità di interazione dei domini più esterni dell'integrina con l'appropriato ligando. Le integrine sono in uno stato inattivo quando la testa è ripiegata verso la membrana plasmatica e a seguito della generazione di un segnale intracellulare si verifica una modificazione che interessa in particolare la catena β per cui la catena α e β si allontanano. Questo comporta una modificazione conformazionale che si trasmette nella parte extracellulare che vede lo specifico ligando e consente l'interazione con esso. Questo fenomeno è stato caratterizzato per le integrine β2 e β3 però esiste anche per alcuni membri della famiglia β1 ed è probabilmente un meccanismo universale di regolazione delle integrine. Dal punto di vista molecolare è dovuto a due proteine: **talina** e **kindlina**. Queste hanno un sito di legame per la sequenza **NXXY** che è membrane distance (cioè nella parte più distante dalla membrana plasmatica della coda citoplasmatica della catena β dell'integrina) o per **NPxY -** membrane proximal (cioè più vicina alla membrana plasmatica sempre della catena β). Il sito di legame per queste 2 sequenze amminoacidiche della catena β è però mascherato, sia nella kindlina che nella talina. Quindi, in condizioni normali, queste due molecole interagiscono con una percentuale molto bassa con le integrine espresse sulla superficie; devono essere in qualche modo modificate per legarsi alla catena β e per stirare la catena β in modo da allontanarla dalla catena α favorendo questa modificazione conformazionale che consente l'interazione tra integrina e il suo ligando. E' un meccanismo molto complesso e solo in parte caratterizzato:

Per la talina si è visto che sia l'interazione con un lipide della membrana, sia il clivaggio con una proteasi che è la **calpaina**, sia eventi di fosforilazione fanno assumere alla talina, che è ripiegata su se stessa con la coda che interagisce con la testa, una conformazione lineare per cui la coda si stacca dalla testa e la testa può legarsi alla sequenza membrane proximal della catena β. (slide 8 lez. 4.1)

Meno chiaro è come fa la kindlina a legarsi alla catena β. Questa molecola presenta un dominio PH che si lega ad un particolare fosfolipide della faccia interna della membrana che è PIP (fosfatidilinositolo-3-fosfato). (slide 9 lez. 4.1)

L'inside-out signaling è un meccanismo di regolazione dell'affinità delle integrine per il loro ligando e questa modificazione, che porta ad un'aumento dell'affinità, viene determinata dal legame alla catena β di talina e kindlina che staccano la catena α e la catena β e determinano una modificazione conformazionale che si trasmette ai domini extracellulari delle integrine.

Questi meccanismi sono stati caratterizzati anche per il ruolo in patologia: ciò che ci interessa è la cascata che regola il reclutamento del leucocita all'endotelio vascolare nel corso di flogosi e di un altro particolare processo che è il ricircolo linfocitario nei vasi sanguigni e nei linfonodi.

Leukocyte adhesion cascade (slide 10 lez. 4.1) Nella prima tappa il **leucocita aderisce all'endotelio** vascolare prevalentemente nella venula post capillare. Questa prima fase è determinata dall'interazione mediata dalle selectine. Queste interazioni favoriscono il fenomeno di **rolling** (rotolamento) per cui il linfocita rotola sull'endotelio vascolare e questo rotolamento è dovuto al fatto che queste interazioni mediate dalle selectine sono relativamente deboli quindi il flusso sanguigno spinge il leucocita sull'endotelio. Questo rotolamento viene poi convertito nello **slow-rolling** che precede l'arresto. L'**arresto** è un fenomeno centrale nel reclutamento leucocitario. Comporta un'adesione salda che fa resistere il leucocita che altrimenti verrebbe portato via dal flusso sanguigno e che precede un fenomeno di **crawling**, fenomeno di migrazione/movimento del leucocita sull'endotelio che precede il passaggio del leucocita attraverso le cellule endoteliali. L'arresto è un fenomeno integrina - dipendente e in particolare dipende dall'attivazione della integrina β2 nei leucociti, in particolare l'αL, ma che in certe popolazioni leucocitarie (come linfociti, monociti, eosinofili) dipende anche dall'attivazione dell'integrina α4 β1. Questa attivazione dipende dal fatto che, rotolando lungo l'endotelio, il leucocita incontra una serie di molecole che sono adsorbite sulla superficie delle cellule endoteliali, legate per esempio all'eparan-solfato che popola l'endotelio vascolare. Queste molecole sono responsabili dell'inside-out signaling in quanto vengono riconosciute da recettori che generano segnali che modificano calpanina e kindlina e tale modificazione consente l'attivazione dell'affinità integrinica e una forte adesione del leucocita all'endotelio. Queste molecole fanno parte della famiglia dei chemotattanti (hanno funzioni chemotattiche) che comprendono sia le chemochine sia altre molecole di origine lipidica.

La leukocyte adhesion cascade è un esempio particolare e importante di attivazione dell'attività integrinica.

Questo fenomeno di arresto del leucocita non si verifica in 3 tipi di patologie che sono le LADS (1,2,3).

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 17/10/2012

Prof. Stefano Dusi

Giulia Deguidi

DANNI DA ALCOL ETILICO

L'alcool etilico, se assunto a basse dosi, può avere **effetti positivi** sull'organismo. Esso infatti:

1. Può attivare le prostacicline (*prostaglandine*) e inibire di conseguenza l'aggregazione piastrinica, mantenendo fluido il sangue, prevenendo la trombosi;
2. Può attivare i sistemi del plasminogeno e della plasmina, favorendo così lo scioglimento dei coaguli (prevenendo la possibilità di trombi) e la circolazione sanguigna;
3. Il vino rosso contiene polifenoli che hanno effetto antiossidante verso le lipoproteine che sono alla base dell'aterosclerosi, della formazione di trombi e dell'infarto;
4. I polifenoli hanno inoltre effetto vaso rilassante, provocano cioè vasodilatazione e perciò favoriscono un calo della pressione sanguigna.

I danni da alcol etilico dipendono da tre fattori principali:

1. **Sensibilità individuale**: la capacità di "reggere" più o meno l'alcol dipende da quanto sono espressi i sistemi di smaltimento/eliminazione dell'alcol (nelle donne tali sistemi sono meno espressi);
2. **Quantità di alcol assunto**: può essere dannosa una quantità superiore a 40/100 g al giorno (10 g corrispondono a 30 ml di bevanda a 43°, come ad esempio la grappa o la vodka);
3. Il parametro più importante è comunque la **regolarità dell'assunzione**: è l'abitudine a bere troppo alcol che danneggia l'organismo, è irrilevante il tipo di bevanda (vino, birra…).

Azione dell'alcol etilico

L'alcol etilico agisce come un debole sedativo, infatti interagisce con i recettori inibitori del mediatore inibitorio GABA, dando, come conseguenza di questo legame, una sensazione di tranquillità e rilassatezza (ciò chiarifica il motivo per cui un soggetto è portato a bere, ovvero per placare l'ansia). I valori standard che ci permettono di avere un quadro generale sul rapporto tra quantità di alcol assunto ed effetti collaterali, sono i seguenti:

- Oltre 40 mg/100 cc di siero: questa quantità di alcol nel sangue possono provocare modificazioni comportamentali (questo è per l'appunto il valore limite nei termini di legge per poter guidare l'automobile)

- Oltre 100 mg/100 cc: scoordinazione motoria, barcollamento

- Oltre 300 mg/100 cc: coma

- Oltre 400 mg/100 cc: può portare a morte per arresto respiratorio

LD50=5g/Kg peso (*dose letale)*

N.B. I valori si alzano negli alcolisti cronici, i quali infatti possono arrivare a tollerare anche 500-600 mg/100 cc (i sistemi di smaltimento vengono up-regolati).

ALTERAZIONI CARATTERISTICHE SVILUPPATE NEGLI ALCOLISTI

Possono essere alterazioni:

1. **FUNZIONALI o COMPORTAMENTALI**
2. **ANATOMICHE**: si verificano solo a seguito di un <u>continuo</u> abuso di alcol e riguardano i seguenti organi:

a) <u>fegato</u>: epatite, steatosi (= accumulo di grassi nel fegato), cirrosi, insufficienza epatica

b) <u>pancreas</u>: pancreatite cronica con dolore, insufficienza d'organo e calcoli

c) <u>cuore</u>: cardiomiopatia (aritmie, insufficienza d'organo = l'organo non è in grado di svolgere le sue normali funzioni)

d) <u>testicoli</u>: ipotrofia con diminuzione della libido, impotenza, ginecomastia (= svilupppo dei caratteri secondari femminili in un soggetto maschile), femminilizzazione per calo di testosterone

e) <u>muscoli:</u> debolezza muscolare, fibrosi

f) <u>tubo digerente</u>: esofagite da reflusso, ulcera, vomito, diminuito assorbimento di aminoacidi e vitamine

g) <u>sangue</u>: anemia megaloblastica (maggior volume dei globuli rossi per deficit di assorbimento dei folati) o emolitica (da splenomegalia per ipertensione portale)

h) <u>cervello</u>: atrofia cerebrale (tossica), encefalopatia carenziale, psicosi di Korsakoff (amnesia e confabulazione = parlare tra sé e sé, farsi domande e auto-rispondersi) e casi estremi di lesioni del cervello e del ponte quali degenerazione cerebellare (turbe della deambulazione), mielinolisi centrale pontina (paralisi respiratoria), ambliopia (alterata visione).

CLASSIFICAZIONE DELL'INTOSSICAZIONE DA ALCOL

È importante distinguere tra due tipi di intossicazione:

- **<u>ACUTA</u>**: si intende l'ubriacatura sporadica, del momento. Essa non provoca quasi mai alterazioni anatomiche bensì alterazioni **funzionali** del sistema nervoso centrale (euforia, depressione, anestesia) dovute all'effetto dell'alcool sui recettori per il GABA. Questo mediatore inibitorio è implicato nel controllo:

- motorio (cervelletto): perciò se viene inibito dall'alcol, ne deriva scoordinazione

- della vista: ne conseguono alterazioni visive

- dell'olfatto: ne conseguono alterazioni olfattive

- del ritmo sonno-veglia: il ritmo viene turbato

- ecc..

Ad alte dosi causa apoptosi dei neuroni.

NB. Le donne gravide dovrebbero astenersi dall'intossicazione acuta in quanto essa può provocare gravi effetti sul feto, dal momento che l'alcol può attraversare la placenta e ridurre così lo sviluppo cerebrale, soprattutto in certe fasi della gestazione; può portare infatti alla perdita di milioni di neuroni nel feto. Ciò è stato dimostrato sia sperimentalmente sia in modello umano.

- **CRONICA:** si intende il continuo abuso di alcol in elevate quantità e provoca **degenerazioni** cellulari (steatosi e necrosi) e alterazioni morfologiche degli organi: epatite alcoolica, cirrosi (fibrosi), pancreatite, ecc..

COME L'ALCOL INTERFERISCE COL FUNZIONAMENTO CEREBRALE

L'alcol interferisce con vari tipi di recettori cerebrali. Il nostro cervello consta di un complesso sistema recettoriale ma possiamo semplificare questo sistema ai 2 principali mediatori cerebrali:

I) GABA = neurotrasmettitore inibitorio che si lega al recettore inibitorio che crea sensazioni di tranquillità e distensione fino alla sonnolenza e all'ipnosi.

II)GLUTAMMATO (acido glutammico) = neurotrasmettitore eccitatorio che inizialmente dà un senso di eccitazione, forza ed euforia e poi degenera in ansia e agitazione.

Dal bilanciamento tra i due deriva gran parte delle nostre normali funzioni psichiche.

L'alcool modifica la funzionalità di entrambi i recettori e questo è alla base delle alterazioni neurologiche legate all'alcolismo.

Esso va così a turbare/influenzare chimicamente l'equilibrio tra questi mediatori, inibendo i recettori del glutammato e stimolando i recettori del GABA: provoca di conseguenza un calo dello stato ansioso e delle sensazioni negative, regalando una sensazione di rilassatezza.

NB. Da ricordare che depressione, schizofrenia ed altre malattie psichiche sono legate ad alterazioni funzionali degli stessi recettori.

Inoltre l'alcool altera i recettori per **oppioidi** e **nicotinici** determinando una cross-reazione e cross-dipendenza con abitudine al fumo e uso di droghe.

L'alcool ha inoltre **effetti indiretti** su questi e su vari altri sistemi di neurotrasmettitori con effetti sia diretti che indiretti (effetto indiretto: attiva protein-chinasi che vanno a fosforilare i recettori).

Analizziamo in modo più dettagliato il **SISTEMA DEI RECETTORI**:

A. RECETTORI PER IL GLUTAMMATO:

il glutammato lega 3 tipi di recettori:

1. **Recettori AMPA** (= alfa-amino 3-idrossi 5-metil- 4-isoxazolo propionic acid)= ingresso di Na+ = depolarizzazione, eccitazione neuronale

2. **Recettori NMDA (**=N-Metil- D-Aspartato) = ingresso di Ca 2+ (**target di alcool ad alta affinità)**
3. **Recettori Metabotropici** = legati a G-protein-trimeriche : attivazione PLC e IP3 che mobilizza il Ca 2+ dal reticolo endoplasmatico che causa attivazione PLA2 con produzione di AA che aumenta il rilascio di glutammato (circolo vizioso)

Implicati in **vie del dolore, controllo motorio,** ecc…

Eccesso di stimolazione:

- attivazione proteasi ---- con attivazione Xantina ossidasi
- attivazione NOS ----- con produzione NO, perossinitrito

(Implicata in Corea di Huntington, SLA, ecc.. *vedi lezioni precedenti*)

L'alcol inibisce specificamente gli NMDA (in quanto si lega ad assi con maggior affinità), inibendo così gli effetti del glutammato che, come già detto, media le sensazioni di ansia ed inoltre agisce come analgesico diminuendo le sensazioni di dolore.

B. <u>RECETTORI DEL GABA</u>:

Questo sistema è molto complesso e finemente regolato.

® Sono eterodimeri (R1 e R2) formati da vari tipi di subunità (19 tipi di subunità in diversa combinazione a seconda dei siti cerebrali) legati a G-protein trimeriche. La fosforilazione da parte della PKC delle subunità modifica il legame al GABA e la conduttanza del recettore (ma non ne altera l'espressione)

® Sono canali del cloro, che quando si aprono iperpolarizzano la membrana cellulare (entrano cioè cariche negative all'interno del neurone) rallentando la trasmissione nervosa

® Solo se dimerizzano vanno sulla superficie cellulare e sono rapidamente internalizzati in assenza di agonisti

® Mediano una lenta e prolungata fase di inibizione sinaptica nel SNC, senza la quale si può avere epilessia, turbe del sonno, stress, depressione, abuso di droghe

® Implicati in controllo motorio (cervelletto), visivo, olfattivo, sonno/veglia

® Diversi tipi di recettori legano diversamente l'etanolo (es. risposte a diverse quantità di alcool) e la loro diversa localizzazione media diversi effetti dell'alcool

® L'etanolo ha poi un'azione indiretta alterando l'espressione e la funzionalità di varie isoforme di PKC nel cervello

C. <u>RECETTORI PER OPPIOIDI:</u>

- Sono recettori legati a G-protein : se ne conoscono di tre tipi: m, d, e k leganti diverse endorfine ed encefaline
- Sono ampiamente espressi nel cervello
- Formano omo- ed etero-dimeri sulla membrana cellulare e associano anche con altri recettori non-oppioidi. Risulta tuttora complicato definire correttamente le funzioni degli omodimeri (ad esempio m-m): alcuni autori sostengono che essi aumentino l'espressione, altri che aumentino l'affinità ecc. Sono perciò in atto molte ricerche in merito. L'unica cosa certa è che essi aumentano l'espressione delle endorfine e di conseguenza aumentano le endorfine che legano gli stessi recettori.
- Come queste associazioni modifichino le proprietà farmacologiche del recettore è un problema tuttora in corso di studio.
- Mediano risposte emozionali, ritmo sonno-veglia, ecc..

D. <u>RECETTORI PER ACETILCOLINA</u>:

- Sono canali ionici pentamerici attivati da ligandi (nicotina, acetilcolina, che è il ligando fisiologico) composti da varie combinazioni di due subunità alfa e beta. Essi vengono legati anche dall'alcol e questo spiega lo stretto rapporto esistente tra abuso di alcol e fumo.

- Implicati in funzioni cognitive, memoria, regolatori generali neuronali

ETANOLO

1. Intossicazione acuta

a. Effetti GABAergici

- azione complessa diretta o indiretta tramite l'attivazione di PKC
- ha gli stessi effetti di: benzodiazepine, ansiolitici, sedativi o barbiturici (che aumentano effetti alcool)
- agisce come ansiolitico, analgesico, sedativo, però comporta anche alterazioni motorie e cognitive (memoria)
- provoca iperalgesia, turbe del sonno = sonnolenza, bradipragia (= rallentamento del movimento), euforia, aggressività

b. Attenuta attività del recettore glutammato NMDA

Alcol lega il recettore in un sito distinto dagli altri modulatori (NMDA= eccitatori, implicati in vie del dolore, controllo motorio, umore). Tale recettore NMDA ha effetti simili alla Ketamina, farmaco euforizzante che viene somministrato per sostituire l'alcol, nel tentativo di far smettere il soggetto di bere, calmandolo ed evitando un' eccessiva sofferenza dovuta all'astinenza.

c. Aumento n° e affinità dei recettori per acetilcolina (nicotinici)

- Implicati in funzioni cognitive, memoria..regolatori generali
- Attivano rilascio di **dopamina** , che media l'effetto piacevole di nicotina e alcool.

La nicotina lega gli stessi recettori acetilcolinici dell'alcol, quindi il fumo condivide lo stesso meccanismo di dipendenza: sono perciò collegati tra loro e per di più si potenziano a vicenda. Si parla perciò di cross reazione tra abuso di alcol, fumo, droghe (la cocaina stimola i recettori NMDA) o sostanze neuromodulatorie. Anche l' acetaldeide (principale prodotto di catabolismo dell'alcol) può attivare direttamente il rilascio di dopamina.

d. Aumento rilascio oppioidi (a livello dell'ipotalamo)

- Comporta (come per il fumo) un aumento della sintesi e del trasporto degli oppioidi. (Non si conosce bene meccanismo di azione sui recettori)
- Effetto morfino-(sensazione di sonnolenza) simile o eroina-(sensazione di forza seguita poi da sonnolenza) simile.
- Effetti discordanti sui recettori

2.Intossicazione cronica

a. Diminuita risposta al GABA

- dovuta a una diminuzione del n° e delle funzioni dei recettori . Col passare del tempo si instaura il fenomeno della tolleranza: se un recettore viene continuamente bombardato, la cellula cerebrale comincia a diminuire il recettore o a diminuirne la responsività, cioè si adatta. Il soggetto di conseguenza per avere gli stessi effetti , necessita di dosi crescenti, ed entra così nel circolo vizioso della dipendenza.

a) provoca ansia, agitazione(stessi sintomi della crisi da astinenza)

b. Aumento espressione e affinità degli NMDA

Aumento risposta al glutammato.

c. Diminuita risposta recettori nicotici

Diminuito rilascio di dopamina (per questo si parla di cross-dipendenza col fumo,cioè aumenta bisogno di alcool + fumo)

c. Diminuzione oppioidi endogeni

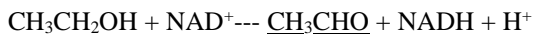
Sindrome da astinenza e conseguente aumento del bisogno di fumo e alcool.

NB. Per curare l'alcolismo risulta necessario curare anche la psiche, perché la ragione ultima che porta all'assunzione CONTINUA e eccessiva di alcol e altre sostanze è l'ansia e l'infelicità del soggetto.

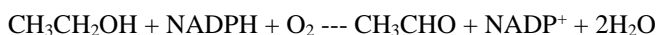
METABOLISMO DELL'ALCOL

L'alcol etilico viene smaltito attraverso 3 vie che lo trasformano abbastanza rapidamente in acetaldeide (la quale viene in parte eliminata tramite il respiro):

- **Alcool deidrogenasi** (enzima che si trova nel fegato e nella mucosa gastrica, quindi lo smaltimento inizia già a livello dello stomaco)

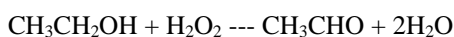
$CH_3CH_2OH + NAD^+$--- $\underline{CH_3CHO}$ + $NADH + H^+$

Questa via forma acetaldeide con aumento di NADH

- **MEOS (microsomal ethanol-oxidizing system)** (nei microsomi del reticolo endoplasmatico liscio)

$CH_3CH_2OH + NADPH + O_2$ --- $\underline{CH_3CHO}$ + $NADP^+ + 2H_2O$

Qui c'è un'intermedia formazione di radicali liberi dell'ossigeno e di altri radicali che possono danneggiare la cellula.

NB. MEOS è importante per il citocromo p450 responsabile dell'idrossilazione di xeno biotici, ovvero sostanze estranee come ad esempio l'alcol.

- **Catalasi** (si trova nei perossisomi)

$CH_3CH_2OH + H_2O_2$ --- $\underline{CH_3CHO}$ + $2H_2O$

Sistema di smaltimento dell'acqua ossigenata; può smaltire l'acqua ossigenata usando l'alcol trasformandolo in acetaldeide.

Quindi: prodotto finale del catabolismo dell'alcol in tutte e tre le vie è l'acetaldeide.

DANNO DA ALCOL

Danni sia diretti che indiretti (per il suo catabolismo).

Il catabolismo dell'alcol provoca danni dovuti a:

a) Aumento di NADH nelle cellule

b) Effetti tossici dell'acetaldeide

c) Effetti tossici dei radicali liberi

d) Effetto diretto dell'alcool

e) Aumento del metabolismo di xenobiotici nel reticolo endoplasmatico iperplastico dell'etilista, con aumentata formazione di sostanze tossiche. Secondo molti autori l'iperespressione dei sistemi del citocromo p450 e di altri sistemi di smaltimento di sostanze tossiche porta all'ipercatabolismo delle sostanze tossiche stesse con intermedia formazione di sostanze genotossiche (ovvero tossiche per il genoma): ciò induce a pensare che l'acetaldeide, principale prodotto del catabolismo dell'alcol, possa provocare danni al DNA ed essere perciò coinvolta nell'insorgenza di tumori.

EFFETTI LOCALI SUI VARI ORGANI:

a) EFFETTI DELL'AUMENTO DEL NADH NELLE CELLULE

Un aumentato rapporto tra NADH/NAD+, comporta le seguenti turbe metaboliche:

1. **Aumentata formazione di acido lattico** (per azione della *lattico deidrogenasi* ,che funziona a NADH, sull'acido piruvico) che porta ad **acidosi** (= diminuzione del pH) e **iperuricemia** (= ritenzione di acido urico nel sangue): l'eccesso di acido lattico in circolo da eliminare compete con l'eliminazione di acido urico da parte del rene. Ciò porta alla formazione di cristalli di urato che si depositano soprattutto a livello delle articolazione di mani e piedi, provocando forti dolori e infiammazioni. Questa malattia viene comunemente detta "gotta" o "podagra" (proprio perché colpisce principalmente il piede e l'articolazione dell'alluce)
2. **Rallentamento del ciclo di Krebs** (che richiede NAD^+) con diminuzione di energia nella cellula.
3. **Aumentata sintesi di acidi grassi** (per trasferimento di H^+ dal NADH in eccesso al NADP con aumento NADPH). Il NADH non può trasferire protoni al NAD+ bensì al NADP, essenziale per la sintesi di acidi grassi.
4. **Diminuita ossidazione di acidi grassi** (che richiede NAD^+) con **steatosi.**

L'aumentata sintesi di acidi grassi (punto 3) con il calo dell'ossidazione (punto 4) provoca la condizione nota come STEATOSI : all'interno degli epatociti vi sono accumuli di trigliceridi, detti "fegato grasso".

b) EFFETTI TOSSICI DELL'ACETALDEIDE

L'acetaldeide ha diversi destini:

1. In parte è trasformata in acido acetico dall'aldeide deidrogenasi. L'acetato lega il CoA e forma Acetil-CoA che però non entra nel ciclo di Krebs (il quale è rallentato per carenza di NAD^+) e viene invece usato per la sintesi di acidi grassi, che così aumenta. Importante ricordare che anche l'acetaldeide deidrogenasi è responsabile della formazione di NADH.
2. Forma legami covalenti con le proteine e ciò porta ad alterazioni strutturali e funzionali (alterazione del metabolismo cellulare), e possibile antigenizzazione = può trasformare proteine self in una struttura tale da essere riconosciute come estranee dal sistema immunitario (provoca autoimmunità).
3. Blocca la secrezione di proteine e lipoproteine da parte del fegato per alterata formazione dei microtubuli, con accumulo di lipoproteine e provoca ulteriormente steatosi per incapacità di formare VLDL e liberare i grassi in eccesso nel sangue.
4. Blocca tutti i gruppi SH (es. gruppi SH del glutatione che serve per proteggerci dal danno ossidativo) con danno ossidativo per deficit di sistemi scavenger dei radicali liberi dell'ossigeno.
5. Danneggia struttura e funzioni dei mitocondri con deficit energetico e ulteriore diminuzione dell'ossidazione degli acidi grassi.
6. Attiva le cellule di Ito del fegato (cellule stellate per l'omeostasi dei sinusoidi), trasformandole in miofibroblasti in grado di sintetizzare collagene. Ciò porta all'insorgenza della **FIBROSI** o anche detta **CIRROSI EPATICA**, in cui le fibre si depositano circolarmente attorno ai lobi del fegato formando i cosiddetti "cirri".

c) EFFETTI TOSSICI DEI RADICALI LIBERI DELL'OSSIGENO (ROS)

I danni da radicali sono quelli trattati nel capitolo “danni da radicali dell’ossigeno”.

Nell’alcoolismo i radicali derivano da:

1. **MEOS**: da cui sfuggono elettroni
2. Iperfunzione del **reticolo endoplasmatico**
3. **Mitocondri danneggiati**: rallentano il flusso di elettroni nella catena respiratoria e perciò perdono elettroni
4. **Xantina ossidasi**. Si attiva perché nell’alcoolismo non c’è disponibilità di NAD^+, utilizzato dalla xantina deidrogenasi che quindi rallenta e viene attivata la xantina ossidasi.

(*allego schema diapositiva n°16, ndr*)

$$\text{(ipo)xantina} + H_2O + NAD^+$$

Xantina deidrogenasi

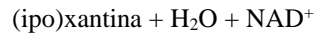
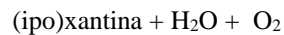
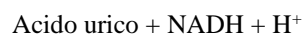
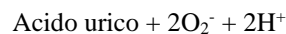
$$\downarrow$$

$$\text{Acido urico} + NADH + H^+$$

$$\text{(ipo)xantina} + H_2O + O_2$$

Xantina ossidasi

$$\downarrow$$

$$\text{Acido urico} + 2O_2^- + 2H^+$$

EFFETTI GENERALI SULL’ORGANISMO:

Oltre ai danni locali(danno epatico, cardiaco, neurologico, enterico, ecc…) l’alcool causa anche effetti generali sull’organismo, tra cui spicca un evidente condizione di **disnutrizione e debolezza generale** (nonostante l’alcol abbia un proprio potenziale calorico) negli alcolisti cronici dovuta a:

1) Ossidazione di gran parte dell’alcool nei microsomi senza conservazione di energia: la maggior parte dell’energia fornita dall’alcol non viene assorbita ma smaltita sotto forma di calore

2) Anoressia dovuta ad aumento di acido lattico e cattiva digestione. Inoltre l’etilista col passare del tempo sostituisce in media il 50% degli alimenti con l’alcool: l’alcolista cronico non si cura più del tipo di alcol che introduce, perché ha bisogno di calmare l’ansia con qualsiasi tipo di alcol (casi di pazienti che bevono l’alcol denaturato, riconoscibile dal colore rosa, venduto in farmacia ad uso esclusivamente medico).

3) Danno a fegato, mucosa gastrica, intestinale (deficit di vitamine, anemia)

4) A questo si aggiunge il deficit del ciclo di Krebs ed il danno mitocondriale con calo di ATP (deficit energetico)

DEFICIT DI TIAMINA

È molto importante il deficit della vitamina B1 o vitamina neuro protettiva o TIAMINA:

La tiamina durante l’assorbimento intestinale è fosforilata con formazione di coenzima tiamina pirofosfato, che ha 3 funzioni:

1) Regolazione della sintesi di ATP (decarbossilazione ossidativa dei chetoacidi)

2) Cofattore nella via dei pentoso fosfati

3) Conserva l’integrità delle membrane neurali e assicura la normale conduzione nervosa (soprattutto periferica) con meccanismi ignoti.

La carenza origina il beriberi (malattia che mostra le caratteristiche tipiche dell’etilista cronico, tipica di paesi orientali in cui ci si ciba principalmente di riso) con la seguente sequenza di eventi:

- **Polineuropatia periferica** simmetrica con degenerazione mielinica e distruzione assonica dei nervi motori e sensitivi e degli archi riflessi (gambe, braccia)
- **Sindrome cardiovascolare** con insufficienza cardiaca e edema periferico
- **Sindrome di Wernicke** con turbe della motilità oculare, atassia (= scordi nazione motoria, barcollamento), confusione mentale, apatia, svogliatezza, e disorientamento nel tempo e nello spazio.
- **Psicosi di Korsakoff** (stadio successivo al Wernicke) con grave alterazione della memoria remota, confabulazione, e incapacità di acquisire nuove informazioni . Ci sono emorragie e degenerazione del talamo, del IV ventricolo, del cervelletto.

RIASSUNTO GENERALE

A. Patogenesi della necrosi da alcool

- Diminuzione del pH cellulare

- Diminuite ossidazioni nel ciclo di Krebs

- Diminuita sintesi di ATP per danno mitocondriale

- Tossicità dei radicali liberi dell’ossigeno

B. Patogenesi della fibrosi o cirrosi alcoolica (riguarda principalmente il fegato ma anche gli altri organi)

- Conseguenza della flogosi o infiammazione (es. epatite alcolica): essa come effetto collaterale danneggia sempre le cellule dell’organo ed è seguita da una certa cicatrizzazione.

- Stimolo dei fibroblasti da parte dell’acetaldeide.

C. Patogenesi della steatosi

1) Aumentata sintesi di acidi grassi per:

a) Aumento di acetil-CoA derivante dall’acetaldeide

b) Aumento di NADPH

2) Diminuita ossidazione degli acidi grassi per diminuzione del NAD^+

3) Diminuito rilascio di acidi grassi con le lipoproteine per:

a) difettosa sintesi proteica

b) alterazione dei microtubuli

4) Aumentata mobilizzazione dei grassi dai depositi conseguente al deficit energetico, con aumentato arrivo di grassi al fegato (sovraccarico) che però non può smaltirli né ossidarli.

Il fegato nell’alcolista cronico risulta quindi grosso, gonfio, soffice, facilmente palpabile sotto l’arcata costale = EPATOMEGALIA.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 22/10/2012

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 22/10/2012

22/10/2012

SBOBINATORE: Ekinde Sean

Prof. Berton

RECLUTAMENTO LEUCOCITARIO, ADESIONE PIASTRINICA, PATOLOGIE

Riassunto **tappe fondamentali** del fenomeno chiamato:”Reclutamento leucocitario”:

1- Interazione del leucocita con l'endotelio attivato (il significato di “attivato” sarà visto più avanti)

2- “Rolling” ovvero rotolamento lungo l'endotelio favorito dal flusso sanguigno che spinge la cellula e dall'adesione della cellula all'endotelio vascolare mediata da interazioni selectino-dipendenti

3-4-”Slow rolling” ed “arrest” entrambe queste fasi sono mediate da interazioni di integrine della famiglia beta-2 (e beta-1 come alfa4beta1 che sarà trattata più avanti) con un controrecettore espresso dall'endotelio vascolare chiamato (adigano? non capisco Ndr) (mentre per le beta uno è presente un altro controrecettore chiamato s...? Ndr). L'arresto è un fenomeno integrino-dipendente ed è essenziale per il reclutamento del leucocita. Esso è dipendente da “inside out signalling”, richiede quindi la stimolazione del leucocita in modo da attivare (modificare) molecole intracellulari come la talina e la tibulina/timbrina (?) che legandosi alla catena beta dell'integrina ne determinano una modificazione conformazionale che si trasmette all'esterno nel dominio che interagisce con il controrecettore (quindi il termine sta a significare un segnale interno con ripercussioni all'esterno)

Queste tappe sono analizzabili studiando una serie di patologie umane dette LAD (Leukocite adhesion deficiency) oggi classificate in tre gruppi: LAD 1,2,3. Le LAD 1 interessano le integrine (difetto di espressione delle integrine della famiglia beta-2); le LAD 2 sono un difetto del rolling (alterazione della sintesi un ligando per le selectine); nelle LAD 3 (ultime scoperte) vi è un difetto nell'attivazione delle integrine (il cosiddetto inside out signalling) quindi nei soggetti affetti da LAD 3 l'espressione delle integrine è normale ma è difettiva la loro attivazione.

Vedi tabella*

PATOLOGIE LAD

LAD 1

Nella LAD abbiamo delle **alterazioni nel gene che codifica per l'integrina beta-2** e la mancata espressione della catena beta-2 comporta la mancata espressione di tutte le catene alfa che si associano ad essa (le più importanti sono: alfa-m alfa-l alfa-x); se queste, una volta sintetizzate nel RE, non trovano la catena beta, vengono degradate.

(Clinica) - I bambini affetti da questa patologia vanno incontro ad un ritardato distacco del cordone ombelicale che richiede un fenomeno infiammatorio con reclutamento di leucociti attorno al cordone , che degradando il tessuto, ne causano il distacco. Questi soggetti vanno incontro ad infezioni ricorrenti dei tessuti molli (mucosa intestinale, mucosa respiratoria, muscolo), in

questi siti di infiammazione sono rintracciabili numerosi microorganismi ma niente pus (cioè pochissime cellule) proprio a causa di alterazioni del reclutamento. Questo alterato reclutamento va di pari passo con un fenomeno di leucocitosi : i bambini affetti da questa patologia da 5-7000 leucociti per mm cubo (valore normale) arrivano a 20-50000 per mm cubo, i leucociti si accumulano nel sangue perchè non riescono a migrare nell'interstizio tissutale dove servono per distruggere i batteri. Questa è una patologia molta grave, corretta esclusivamente con il trapianto di midollo, in alternativa si deve ricorrere a trattamenti prolungati con antibiotici che divengono poi incompatibili con la vita, i bambini che riescono a salvarsi sono quelli in cui grazie al trapianto di midollo compatibile si riesce a reintegrare la funzione leucocitaria.

LAD 2

Emersa successivamente, quando si notarono casi di LAD con identica sintomatologia (infiammazione senza pus) ma espressione di integrina beta-2 normale: questo portò a pensare che l'alterazione potesse riguardare il **rolling** (fenomeno selectino-dipendente in cui le selectine riconoscono residui polisaccaridici nel contesto di glicoproteine, in particolare, riconoscono polisaccaridi complessi che contengono acido sialico, n-acetilglucosamina e fucosio). Il **gene alterato è un trasportatore di fucosio nel Golgi** per cui le glicoproteine non ricevono (nel Golgi) il loro uncino di fucosio; ciò comporta una minore affinità con le selectine e quindi un ridotto rolling. Il fucosio serve anche per glicoproteine di superficie delle cellule del SNC, ciò causa ritardo mentale negli affetti per alterazioni nelle interazioni sinaptiche durante il differenziamento. La LAD 2 rende evidente l'importanza del rolling nel reclutamento leucocitario, il rotolamento è essenziale perchè i leucociti possano interagire con una serie di molecole che attivano l'insideout signalling che sono le chemochine e altri chemotrattanti che generano quei segnali che poi attivano le integrine.

LAD 3

Scoperta inizialmente studiando famiglie turche emigrate in Olanda poi anche in Germania. Manifestazione clinica simile alla LAD 1 complicata da fenomeni emorragici. L'espressione di integrine beta-2 risulta normale e il contenuto di fucosio dei controrecettori per le selectine è altresì normale. Vi è **un'alterata affinità delle integrine beta-2 e beta-3** causante sia una patologia leucocitaria sia piastrinica ciò perchè le integrine beta-3 (in particolare alfa2b-beta3) sono **essenziali per l'aggregazione piastrinica e la riparazione dei danni vascolari** che comporterebbero emorragie. Lo studio della LAD 3 ha permesso di comprendere i meccanismi di insideout signalling. Nei soggetti con LAD 3 in età giovanile si osserva osteopetrosi, gli osteoclasti sono cellule della linea mieloide aderenti alla matrice ossea grazie alla presenza di podosomi (evaginazioni della membrana plasmatica) strettamente dipendenti dalle integrine e taline sono importanti per convertire l'integrina in uno stato di alta affinità e collegano l'integrina ad una serie di proteine citoscheletriche compresa l'actina polimerizzata che consentono la strutturazione di queste evaginazioni della membrana plasmatica chiamate podosomi (nel contesto delle cellule mieloidi) e invadopodi (nel contesto delle cellule neoplastiche).

ADESIONE PIASTRINICA

I meccanismi emostatici sono basati su una serie di risposte di cui alcune transitorie e limitate ad un distretto vascolare. Qualsiasi **danno ad un vaso** o ad una regione limitrofa determina una stimolazione dei terminali nervosi che comportano una **reazione vasocostrittiva** per ridurre l'uscita di sangue. **Successivamente** entrano in gioco **2 risposte**:

1. la formazione del tappo piastrinico (o tappo emostatico)
2. l'attivazione del processo coagulativo (con formazione del coagulo).

Questi processi sono strettamente legati: **le piastrine regolano il processo coagulativo ed allo stesso modo questo regola la risposta piastrinica**. Per quanto riguarda il loro coinvolgimento nei vari distretti vascolari risultano invece separati: le piastrine sono implicate nell'emostasi primaria che risulta sufficiente ad impedire processi emorragici nei piccoli vasi del microcircolo (per questo la patologia dell'adesione piastrinica comporta l'emorragia dei piccoli vasi come a livello della superficie cutanea o delle mucose).

Le Piastrine

Le **piastrine** sono capsule citoplastiche anucleate originatesi nel midollo osseo (vedi schema). Vengono **rilasciate dai megacariociti** (cellule più grandi presenti nel midollo osseo), (policarioni) multinucleati (vedi disegno per dimensioni), presentano evaginazioni del plasmalemma che distaccandosi conservano alcuni elementi del citosol pur rimanendo prive di nucleo (piastrine).

Le piastrine sono circa **150-400mila per millimetro cubo o microlitro**, hanno una vita breve (6 giorni) al termine della quale vengono eliminate da modificazioni della membrana plasmatica. Nel processo differenziativo delle piastrine entrano in gioco diverse citochine, la **trombopoietina** (citochina principale) è presente in tutte le tappe, importante per la differenziazione del megacariocita. Da ogni megacariocita derivano 8-9mila piastrine. La caratterizzazione della trombopoietina è importante per l'identificazione di possibili vicari (sono già disponibili molecole vicarianti poco usate per via degli effetti collaterali).

Le piastrine sono cellule discoidali con importanti invaginazioni della membrana plasmatica costituenti un sistema canalicolare collegato alla superficie che amplifica l'interazione di componenti interni alla piastrina con la membrana plasmatica. Le piastrine utilizzano la membrana plasmatica per la produzione di molecole biologicamente attive, evento centrale dell'emostasi piastrinica. Allo stesso modo le piastrine espongono (modificando la loro forma) i tubuli citoplasmatici all'esterno, la cellula si appiattisce e vengono rilasciati dei **granuli** classificati in:

-granuli alfa e granuli densi (o granuli beta), importantissimi nell'aggregazione piastrinica e in generale nell'emostasi;

-esiste un'altra popolazione di granuli: i classici lisosomi. Le piastrine hanno infatti un ruolo nell'immunità innata: sono in grado di uccidere cellule aderendovi e rilasciando idrolasi acide.

Sono presenti **mitocondri per la fosforilazione ossidativa** e centinaia di molecole di **mRNA** derivanti dal citosol del megacariocita utilizzate per sintetizzare numerose proteine utili nel contesto emostatico e infiammatorio. In alcune patologie infiammatorie croniche (es. artrite reumatoide) l'adesione prolungata di piastrine all'endotelio vascolare alterato accompagnata alla sintesi di citochine come IL-1 amplifica il danno infiammatorio.(vedi scansione microscopio elettronico di piastrina)
Nell'immagine è visibile la forma discoidale, in seguito a stimolazione le piastrine possono cambiare forma, nell'immagine sono infatti visibili [fori di membrana chiamati lamello-anello (?) podi formatisi in seguito alla polimerizzazione dell'actina, pseudopodi aumentano la superficie di contatto della piastrina con l'esterno e la superficie utilizzata per rilasciare il contenuto dei granuli all'esterno.

EMOSTASI PRIMARIA

(disegno riassuntivo emostasi primaria)

1- <u>ADESIONE</u>: le piastrine circolano nel sangue e non aderiscono all'endotelio vascolare integro, ma sono in grado di aderire a tutto quello situato al di sotto. Qualsiasi danno che esponga il connettivo sottoendoteliale genera una rapida adesione delle piastrine al sottoendotelio, questo fenomeno è regolato.

2-<u>SHAPE-CHANGE</u>: (modificazione di forma) le piastrine non rimangono discoidali ma vanno incontro ad un fenomeno detto "spreading": formazione di fogli di membrana pieni di actina polimerizzata (immagine).

3-<u>REAZIONE DI RILASCIO</u>: le piastrine rilasciano all'esterno componenti essenziali per il fenomeno emostatico. All'interno della reazione di rilascio si possono identificare due eventi separati dal punto di vista biologico e da quello della loro regolazione.

1. **Rilascio di molecole neoformate in seguito a stimolazioni che la piastrina riceve in seguito all'adesione**, queste sono **derivati di acidi grassi presenti nei fosfolipidi della membrana**, in particolare acido arachidonico (acido grasso localizzato in posizione 2 del fosfolipide di membrana). Il distacco dell'acido arachidonico successivo all'attivazione della fosfolipasi a2 comporta la sua metabolizzazione da parte di una serie di enzimi, tra cui ciclossigenasi che lo converte in tromboxano 2 (molecola essenziale nell'aggregazione piastrinica). L'aspirina inibisce la sintesi di ciclossigenasi da parte delle piastrine quindi l'uso prolungato di aspirina comporta rischio di sanguinamento, non va usata quindi nelle donne in età fertile durante il ciclio mestruale perchè aumenta il sanguinamento.
2. **Rilascio di granuli alfa e beta** contenenti molecole solubili che possono essere rilasciate all'esterno, inoltre i granuli possono fondersi con la membrana senza rilasciare molecole all'esterno ma immettendo una molecola nel plasmalemma. Questo fenomeno è detto aggregazione secondaria (deriva dall'inserimento in membrana di una serie di recettori accompagnato dal rilascio di molecole adesive all'esterno) e comporta un'aggregazione stabile ed irreversibile delle piastrine con formazione di un tappo piastrinico.

4-<u>RECRUITMENT:</u> gli eventi di adesione,reazione di rilascio ecc.. stimolano l'interazione tra piastrina e piastrina che formano il "**tappo**", fenomeno distinto dall'adesione e definito "**aggregazione**" (omotipica perchè sono coinvolta cellule uguali, in caso contrario sarebbe eterotipica come nel reclutamento leucocitario in cui il leucocita aderisce alla cellula endoteliale).

(figura raffigurante difetti aggregazione piastrinica)

Molecole importanti per l'aggregazione piastrinica:

1. E' visibile un **recettore** (integrina alfa2b-beta1) selettivo per il collagene che quindi media un'interazione diretta dell'integrina con il sottoendotelio.
2. Un'altro importante sistema di adesione è rappresentato da una proteina circolante nel plasma chiamata "**fattore di Von Willebrand**". Questo fattore, nel contesto dell'adesione piastrinica, ha permesso di definire una nuova forma di regolazione dell'adesione che non dipende dalla regolazione del recettore (come per le integrine) ma dal ligando (rappresentato appunto da questo fattore). Questa molecola circola nel plasma ove normalmente non interagisce con le

piastrine, viene riconosciuto da queste solo quando lega il collagene sottoendoteliale (quindi in seguito ad una perdita di endotelio)ciò causa dei cambiamenti conformazionali che lo rendono riconoscibile dal recettore piastrinico che risulta già espresso e non regolato.

3. Terza molecola importante nella formazione del tappo piastrinico **chiamata integrina alfa2b-beta3**, regolata da insideout signalling, promiscua nella capacità di legame; il suo ligando elettivo è il fibrinogeno che è presente in elevate concentrazioni nel plasma.

PATOLOGIE DELL'ADESIONE PIASTRINICA

Questi 2 eventi adesivi più l'evento di aggregazione rappresentano un punto di studio fondamentale per i meccanismi emostatici piastrinici ed in generale per tutti i meccanismi adesivi poiché sono state identificate 3 patologie in grado di alterarli.

- La **prima patologia** è la **sindrome di Bernard-Soulier** in cui vi è un difetto nell'espressione dei recettori per il fattore di Von Willebrand, la piastrina, mancando di questo recettore, non riconosce più il fattore legato al collagene.
- La **malattia di Von Willebrand** è la patologia speculare a quella appena citata. Von Willebrand fu un medico danese che intorno fine 800' inizio 900' identificò una patologia del sistema emostatico differente dalle emofilie allora conosciute in quanto si trasmetteva con un meccanismo genetico diverso (AD e non legato al sesso come per le emofilie); scoprì la patologia in residenti in piccole isole danesi. Questa coaugolopatia è una delle più diffuse nella popolazione caucasica (1 su mille affetto), può passare da forme molto lievi di cui ci si accorge per caso a forme gravi. Questa malattia genetica dipende dai diversi gradi di espressione del gene (per il fattore di Von Willebrand) che può risultare silenziato o codificare per una proteina non in grado di legare il collagene per formare i multimeri riconosciuti dal recettore sulle piastrine.
- La **terza malattia** genetica importante è la **tromboastenia di Glanzmann**. Simile ad una LAD è dovuta ad un difetto di espressione dell'integrina alfa2b-beta3 dovuto a mutazioni del gene che codifica per questa (a queste patologia è associabile anche LAD3 che presenta alterazioni dell'emostasi piastrinica dovute ad anomalie nell'attivazione insideout dell'integrina piuttosto che alla sua espressione).

Il recettore per Von Willebrand è una molecola molto complessa composta da tre subunità: Gp9 subunità con catena alfa e beta unite e poi una subunità, una glicoproteina e.. Ndr.

<u>Come facciamo a distinguere una malattia di Von Willebrand da una sindrome di Bernard-Soulier?</u>

In entrambe si ha un difetto di adesione, in un caso manca il fattore di Von Willebrand, nell'altro manca il recettore.

Per molti anni è stato utilizzato il <u>test della ristocetina</u> per capire il quale è necessario parlare dell'aggregometro, strumento essenziale per misurare la funzione piastrinica ed in particolare la velocità di aggregazione in vitro. Vengono utilizzate piastrine prelevate dal sangue (usando il plasma ricco di piastrine ottenuto centrifugando a 200 g il sangue, scendono i globuli rossi e bianchi mentre le piastrine, più piccole, rimangono in superficie). Inserendo le piastrine (in provetta) nell'**aggregometro** questo tramite un raggio di luce che penetra più o meno in profondità (bloccato dalle piastrine disperse e quindi non aggregate credo Ndr*) riesce a determinare il grado di aggregazione piastrinica (si sfrutta il fenomeno della trasmittanza). Se stimolassimo l'aggregazione piastrinica con molecole definite "aggreganti piastrinici"le piastrine aggregate lascerebbero ambi spazi per il passaggio della luce quindi si visualizzerebbe una curva descrivente il graduale aumento di aggregazione fino al raggiungimento di un plateau (punto di massima aggregazione piastrinica).

Sfruttando questo principio, negli **anni sessanta**, emerse in commercio l'**antibiotico "ristocetina**" che venne immediatamente **ritirato perchè causava microtrombi** nel microcircolo di soggettti di diversa età, sia pediatrica sia adulta.

COME? Studiando questo antibiotico si notò che esso lega il fattore di Von Willebrand e ne determina la modificazione conformazionale che promuove la sua aggregazione in multimeri (la stessa modificazione che in vivo viene indotta dal collagene), l'effetto non è pari a quello del collagene ma comunque sufficiente ad attivare il fattore di VW e far sì che si leghi alle piastrine nel plasma; questi aggregati VW+piastrine si possono arrestare nei piccoli vasi del microcircolo determinando ischemie transitorie nel tessuto irrorato da questi.

L'antibiotico ritirato dal commercio divenne **un'utile strumento per fare diagnosi differenziale di malattia di VW e patologia di BS**. Usando ristocetina sia in un soggetto con malattia di VW sia in uno con patologia di BS non si osserva il fenomeno di aggregazione; nella VW perchè non abbiamo il fattore di VW, nella patologia di BS perchè non abbiamo il recettore sulle piastrine.

Si preleva un'aliquota di plasma da un soggetto normale e lo si aggiunge al sistema; se il soggetto ha la malattia di VW (dato che il plasma normale contiene fattori di VW) si ricostituisce il fenomeno di aggregazione, se il soggetto ha la sindrome di BS non avviene aggregazione (perchè la piastrina resta incapace di riconoscere il fattore di VW).

Oggi ovviamente esistono metodi immunochimici per queste diagnosi (anticorpi e citofluorimetro).

Sono **ora disponibili nuovi sistemi** che permettono di studiare il fenomeno dell'adesione piastrinica (e soprattutto il passaggio da adesione ad aggregazione) sotto flusso. In questa situazione la piastrina interagisce direttamente con componenti della matrice extracellulare o indirettamente tramite fattore di VW.

Struttura del fattore VW e alterazione del clivaggio

Il fattore di VW è composto da diversi domini e il recettore (che successivamente riconosce anche il collagene) media (tramite questa serie di interazioni) l'attivazione dell'integrina alfa2b-beta3; ciò comporta che altri siti di legame per il fattore di VW vengano riconosciuti da questa integrina alfa2b-beta3 attivata (con meccanismo di insideout) e comportano anche l'inizio dell'interazione con altre piastrine tramite il riconoscimento del fribrinogeno (formazione dei primi ponti interpiastrinici per l'aggregazione Ndr*) sempre da parte di questa integrina. Abbiamo quindi sia il fenomeno di stabilizzazione dell'adesione sia quello di innesco dei processi di aggregazione. (vedi immagine, frecce importanti). I segnali generati non derivano soltanto dalle molecole adesive ma anche dalla stimolazione delle piastrine, da parte da altri fattori come i derivati dell'acido arachidonico (tromboxani), al rilascio di molecole aggreganti che ottimizzano questo fenomeno. Il fenomeno di adesione e aggregazione piastrinica inizialmente sembrava essere condizionato soprattutto da fenomeni di ridondanza (vi sono infatti molti meccanismi adesivi e diversi recettori per fattori aggreganti) interpretati come favoriti dal processo evolutivo (processi emostatici efficaci in situazioni di pericolo come fuga da predatori) che quindi scoraggiavano interventi farmacologici (per evitare di migliorare una cosa a discapito di un'altra). In realtà successivamente tutti questi sistemi, sia adesivi sia deputati al riconoscimento di molecole aggreganti, risultarono caratterizzati da una forte integrazione (per cui il blocco di uno solo di questi inibisce fortemente il processo adesivo e aggregativo ma non lo silenzia del tutto). (altra immagine sull'argomento).

Il **fattore di VW** è per gran parte **sintetizzato da cellule endoteliali** ed è utilizzato come marker per queste ultime. Le cellule endoteliali contengono delle vescicole contenenti VW (ricche anche di altre molecole). (nomi ricercatori che le scoprirono).

In seguito alla fusione di queste vescicole con il plasmalemma il VW **viene esposto sulla membrana plasmatica della cellula endoteliale** per un tempo relativamente breve in cui si verificano **fenomeni di clivaggio che lo liberano nel plasma** dove può assumere diverse conformazioni (lineari, aggregate) ma è importante che mantenga una conformazione non legante le piastrine.

Successivamente al legame con il collagene, il VW subisce modificazioni conformazionali che ne consentono il riconoscimento da parte delle piastrine.

Se il fattore di VW rilasciato dalla cellula endoteliale (o che rimane esposto sulla sua membrana) **assume** invece una **conformazione promuovente la formazione di multimeri** può interagire con le piastrine in circolo andandosi a localizzare (in aggregati) nel microcircolo con conseguenze importanti sia dal punto di vista ischemico sia emorragico.

Microangiopatie trombotiche

Da quest'ultimo punto di vista esistono delle patologie chiamate **microangiopatie trombotiche**: il paziente affetto da queste giunge solitamente al pronto soccorso con estese emorragie di superficie e mucose (il decorso può essere molto rapido e grave, mortalità fortunatamente è controllata ma può essere comunque molto alta). Si osservano:

-grave trombocitopenia (ridotto numero piastrine),

-fermentazione eritrocitaria (con lisi degli eritrociti e rilascio degli enzimi eritrocitari in essi contenuti),

-danni tissutali derivanti da un processo di formazione di microtrombi ostruenti i vasi trofici.

Le microangiopatie trombotiche sono classificabili nel gruppo delle **“patologie a consumo**” in cui vieni iperattivato un sistema con conseguenze dannose che in questo caso consistono in lesioni trombotiche dovute all'arresto degli aggregati di VW e piastrine nel microcircolo; inoltre, l'alto utilizzo di piastrine priva il sangue di queste ultime (trombocitopenia). La formazione di nuove piastrine richiede tempo per cui gli affetti che giungono al pronto soccorso presentano livelli di piastrine inferiori a 5000 per microlitro rispetto alle 150-400mila fisiologiche, ciò comporta un grave rischio di complicanze emorragiche. In clinica queste microangiopatie trombotiche **sono classificate in due forme:**

- Sindrome di Moschowitz detta porpora trombotica trombocitopenica TTP (per descrivere appunto l'associazione di fenomeni emorragici e trombocitopeni i) caratterizzata da:

-grave trombocitopenia,

-fenomeni di anemia emolitica

-formazione di microtrombi in diversi distretti con danni neurologici anche importanti,

-insufficienza renale.

La sua classificazione non fu facile, si pensava fosse una forma idiopatica (cioè dovuta a cause non note) invece poi emerse che queste forme congenite idiopatiche sono dovute alla mutazione del gene codificante per ADAMTS13 o, in certe patologie autoimmuni, ad autoanticorpi inibenti ADAMTS13.

- Esistono altre forme derivanti da alcuni tipi di tumori, uso di farmaci in gravidanza, complicanze post-trapianto che sono difficili da interpretare. E' una classica microangiopatia trombotica con tutte le conseguenze del caso, però, la formazione di microtrombi interessa quasi esclusivamente il rene (la patologia originaria è a livello renale). Questi casi sono preceduti da fenomeni diarroici (diagnosi differenziale), spesso con perdita emorragica, causati da particolari ceppi di GRAM- producenti un particolare tipo di tossina. La diagnosi differenziale viene quindi fatta a posteriori ricercando questi microorganismi e la tossina.

In entrambi i casi i globuli rossi, modificati dall'urto contro i microtrombi, divengono schistociti nei quali v'è un danno della membrana plasmatica che altera i flussi in entrata/uscita.

-

Cosa avviene in una microangiopatia trombotica?

Il fattore di VW presenta diversi domini riconosciuti da diversi recettori e presenta dei siti che vengono clivati da **ADAMTS13**. Per definire ciò che avviene in una microangiopatia trombotica fu utilizzato un sistema ex vivo in cui venivano fatte scorrere piastrine lavate (quindi non più sospese nel plasma) e marcate con colorazione fluorescente su un monostrato di cellule endoteliali, in particolari condizioni di danneggiamento dell'endotelio si osservò che le piastrine si fermavano su di esso come se riconoscessero qualcosa a cui legarsi. Questo fenomeno non ha luogo se il monostrato endoteliale viene prima trattato con plasma normale che impedisce l'interazione tra piastrina ed endotelio suggerendo come nel plasma sia presente una componente in grado di impedire questa interazione. Utilizzando (come plasma normale) il plasma di soggetti affetti dalla sindrome di Moschowitz questo fenomeno non avviene (perchè manca questo fattore inibente) e le piastrine si attaccano all'endotelio come succede con le piastrine lavate.

Nel processing del fattore di VW una tappa importante è rappresentata dall'esposizione di questo sull'endotelio in seguito alla fusione del corpo di (?) (vescicola Ndr) con il plasmalemma. Questo fattore di VW presente in forma multimerica deve essere clivato da ADAMTS13, i frammenti derivanti dal clivaggio vengono ulteriormente clivati da ADAMTS13 durante la circolazione nel plasma. In caso di mancanza per motivi genetici o inibizione da anticorpi di ADAMTS13 questo fattore di VW multimerico rimane sulla sulla superficie della cellula endoteliale, **se invece viene in parte clivato rimane multimerico nel plasma causando fenomeni di aggregazione piastrinica causanti microaggregati che ostacolano il flusso sanguigno.**

L'adesione piastrinica è un fenomeno molto ridondante. Vi sono integrine come alfa2beta1 e alfa5beta1 che riconoscono componenti della matrice extracellulare come collagene e fibronectina, alfa2beta3 che riconosce un'altra proteina della matrice extracellulare (vetronectina), un recettore (particolarmente importante nell'attivazione piastrinica) appartenente alla superfamiglia delle immunoglobiline che riconosce il collagene ed attivare l'integrina alfa2b-beta3, il fattore di VW che regola l'adesione e favorisce l'aggregazione piastrinica (inserendosi tra diverse piastrine), l'alfa2b-beta3 recettore per il fibrinogeno (riconosce però

anche altre molecole come fibronectina, ecc...) la cui mancanza determina la tromboastenia di Glantzmann, CD86 (menzionato nei recettori scavenger) in grado di riconoscere una proteina contenuta nei granuli piastrinici ovvero la trombocit(?).

Negli ultimi anni sono emersi altri tipi di interazioni come quello mediato dalla molecole JAM-A (implicate anche nel reclutamento leucocitario), queste molecole sono in grado di interagire una con l'altra e vengono espresse dalle piastrine successivamente alla loro attivazione, possono essere espresse dall'endotelio alterato in quanto nell'endotelio integro sono espresse tra cellula e cellula (e non nel lato apicale) per cui non possono essere viste dall'esterno; in caso di danno, le giunzioni cellulari si alterano e le JAM-A migrano sulla faccia apicale favorendo l'interazione piastrina-endotelio. Le proteine JAM-A/B/C sono state caratterizzate anche nelle interazioni tra piastrine e leucociti, questi hanno tra loro diversi meccanismi di interazione importanti nella modificazione di una serie di risposte infiammatorie come la degradazione del coagulo (essenziale per smaltire i coaguli che altrimenti ostruirebbero i vasi). Il processo emostatico è quindi regolato anche da un processo di degradazione del coaugulo sostenuto da un meccanismo fibrinolitico e da cellule leucocitarie (in particolare monociti) che aderiscono agli aggregati piastrinici degradandoli.

SLIDE LEZIONE 4.1 - 4.2 (ALTERAZIONE_REC_ADESIVI)

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 23/10/2012

Lezione di patologia generale e fisiopatologia del 23/10/2012

Sbobinatore: Falceri Alice

Revisore: Santoro Chiara

Prof. Stefano Dusi

INVECCHIAMENTO

Gli studi riguardanti l'invecchiamento sono stati eseguiti su due fronti:

- Considerando l'invecchiamento come **<u>processo programmato</u>**, dunque cercando eventuali geni coinvolti.
- Considerando l'invecchiamento come **<u>processo acquisito</u>**, che potrebbe essere la somma di danni più o meno contrastati da sistemi riparativi. É possibile distinguere in questo ambito tra un invecchiamento puro, che colpisce tutti, ed uno causato da malattie, che colpisce invece solo una frazione di individui *(NB: registrazione molto disturbata e incompleta, non posso confermare; negli appunti avevo aggiunto anche che era necessario separare l'invecchiamento dalle malattie a esso correlato per studiarlo da questo punto di vista. NdR)*

Gli studi sull'invecchiamento sono stati condotti:

- identificando geni chiave
- studiando malattie che causano invecchiamento prematuro (progeria, sindrome di Werner)
- eseguendo esperimenti per correlare invecchiamento, alimentazione, danno cellulare, ecc...

- studiando centenari sani
- eseguendo studi su cellule tumorali, perché non subiscono invecchiamento

Parametri longevità

- **DURATA MEDIA DELLA VITA**: rappresenta l'aspettativa di vita, ovvero l'età cui sopravvive il 50% dei nati. É aumentata per il miglioramento delle condizioni igieniche, vaccinazioni, terapie, presidi medico-sanitari. Ai nostri giorni la durata media della vita si aggira sui 75-80 anni (era 60-70 anni).
- **DURATA MASSIMA DELLA VITA**: limite massimo di durata di vita di una specie. Nell'uomo questa arriva a circa 90-100 anni, a parte qualche raro caso; nel topo è di 2 anni, mentre nel cane è di 20 circa (inoltre cani di piccola taglia vivono più a lungo di quelli di grossa taglia). La durata massima della vita non si è modificata nel tempo, quindi torniamo all'ipotesi di una possibile determinazione genetica.

Studio sui centenari sani

- Si tratta di uno studio condotto dall'università di Modena su **centenari sani** nel mondo per vedere se questi soggetti potevano dirci qualcosa in più riguardo il processo dell'invecchiamento;
- Sono così definiti perché non presentano patologie responsabili dell'accorciamento della vita (diabete, traumi, infezioni, cardiopatie), quindi hanno affrontato un invecchiamento puro.
- Varie indagini su questi soggetti hanno fatto emergere questi dati:
- i discendenti di genitori longevi vivono più a lungo (fattori genetici);
- tra i centenari il rapporto donne/uomini è 5:1 (fattori ormonali);
- la nutrizione è un fattore importante: questi individui avevano riferito di avuto nella loro vita un'alimentazione molto semplice, ricca di vegetali e povera di zuccheri, infatti molti erano contadini o pastori (fattori esogeni). Anche altri studi hanno portato a considerare l'alimentazione come un fattore importante nell'invecchiamento;

â—¦ conducevano una vita non sedentaria (attività fisica);

â—¦ dichiaravano di aver avuto una vita felice e priva di stress (fattori psicologici);

Vediamo quindi come ci siano molti fattori coinvolti nella patogenesi dell'invecchiamento:

Patogenesi dell'invecchiamento

Perché si invecchia?

- **Diminuzione di numero delle cellule**: questo fenomeno si presenta in tutti gli organi. Per esempio a partire dai 20 anni in poi noi perdiamo miliardi di neuroni al giorno che non vengono recuperati (il mantenimento della lucidità mentale non

dipende dal numero di neuroni, ma dal numero di interconnessione tra neuroni, che aumenta mantenendo in allenamento la mente con attività di vario genere)

- **Deficit funzionale delle cellule**: diminuzione dell'attività replicativa delle cellule. Le cellule staminali non riescono più a sostituire le cellule vecchie che vengono eliminate. Il deficit funzionale però non è solo di tipo replicativo.

- **Alterazioni morfologiche delle cellule invecchiate**: queste possono essere distinte visivamente al microscopio e sono determinate da:

â—¦ fenomeni di ossidazione, come la lipoperossidazione delle membrane;

â—¦ accumulo di sostanze fluorescenti, definiti pigmenti da usura (derivano dalla degradazione delle membrane interne), che sono anche usati come un marcatore dell'invecchiamento cellulare;

â—¦ alterazione delle proteine (es. glicazione, cioè il legame di glucosio alle proteine);

â—¦ accumulo di mutazioni del DNA, che derivano da una diminuita capacità di intervento dei sistemi riparativi nucleari.

Il fatto che nelle cellule si osservino tutte queste alterazioni, ha fatto pensare che la **teoria del deterioramento**, ovvero che le cellule invecchino e si deteriorino con l'età, non sia un'ipotesi sbagliata. Il deterioramento deriva da:

- **INSULTI ESOGENI**: tra i quali il più importante risulta la sregolazione alimentare, ma intervengono anche radiazioni, inquinamento, malattie, fumo.

- **INSULTI ENDOGENI**: di cui il più importante è il danno mediato da radicali liberi, che possono creare danno a molte strutture quali lipidi, DNA, proteine; infatti il danno ossidativo simula molto bene il danno che si risconta nelle cellule dell'anziano.

Teoria dei radicali liberi dell'ossigeno

Questa teoria sostiene che gran parte dell'invecchiamento sia legato a usura da danno ossidativo.

- A sostegno della teoria dei radicali ci sono parecchi studi tra cui quello della creazione di una Drosophila longeva (vita 34% più lunga) **facendole iper-esprimere SOD e catalasi** (enzimi che servono per disintossicare le cellule dai radicali liberi);

- C.Elegans (nematode) raddoppia la sua vita (che normalmente è di 20 giorni) tramite **l'inibizione del gene *age-1***, la cui soppressione porta ad aumentata sintesi di SOD e catalasi. Dunque anche in questo organismo, come in Drosophila, aumentando la protezione conto i radicali, aumenta la durata della vita;

- con l'età c'è un aumento dei **gruppi carbonilici**, che sono un marcatore di danno ossidativo delle proteine;

- il **metabolismo basale** (fonte di radicali liberi dell'ossigeno) di una specie è inversamente proporzionale alla sua durata di vita (es. le tartarughe che sono molto longeve presentano un metabolismo basale più basso di animali a vita più breve)

- le specie più longeve (es. elefante, uomo) producono più SOD;

- Nelle malattie caratterizzate da invecchiamento precoce è stata osservata un'aumentata ossidazione delle proteine;

- con l'età si osserva diminuzione dei sistemi difensivi nei confronti dei radicali liberi (SOD, catalasi, glutatione, ecc..);

- nei centenari sani c'è maggior capacità si resistere allo stress ossidativo (es. c'è minor quantità di LDL ossidate. L'ossidazione di LDL è causa di aterosclerosi).

NB:L'aterosclerosi è un indurimento delle arterie che si osserva con l'età, e questo avvenimento è proprio collegato con l'ossidazione delle lipoproteine che si depositano sotto l'endotelio, sclerotizzando, cioè indurendo le arterie.

- I radicali liberi colpiscono in particolare i mitocondri, che sono la principale fonte di radicali nelle cellule (la xantina ossidasi interviene solo in caso di ischemia, mentre la NADPH ossidasi interviene solo in certi tipi di cellule, principalmente leucociti) infatti il loro DNA risulta essere meno protetto rispetto a quello nucleare, perché non ha istoni ed è meno fornito di enzimi riparatori. Il danno mitocondriale causa un calo di energia da diminuzione di sintesi dell'ATP, e quindi la cellula non riesce più a rinnovare le sue strutture interne e replicarsi, ne consegue un invecchiamento per mancanza di energia. Se le cellule non possono essere rinnovate invecchi l'organo e quindi anche l'organismo.

Teoria del danno genomico

- I genetisti sostengono che con l'età c'è **aumento dell'instabilità genetica e facili mutazioni**, dunque probabilmente gran parte dell'invecchiamento sarebbe causato da conseguente alterata funzionalità della proteina, che produce alterata funzionalità della cellula.

- Questa teoria non è in contrasto con quella dei radicali liberi, anzi si concilia con essa, perché i radicali liberi possono danneggiare il DNA e causare tumori.

Teoria del danno neurologico

- Con l'età c'è **perdita di neuroni**, che causa tendenza ad atrofia cerebrale (diminuzione volume cerebrale) e aumento della glia. Nei neuroni compaiono inoltre accumuli di **ammassi neurofibrillari**, derivanti da alterazione del citoscheletro, e di **lipofuscina**, pigmento fluorescente derivato da parziale digestione delle membrane interne;

- c'è deposizione di **amiloide** nei vasi e negli spazi extracellulari del cervello (l'amiloide è una sostanza a beta-foglietto che si deposita in certe quantità anche in soggetti sani, mentre quando si deposita in quantità eccessiva determina una condizione patologica caratterizzata da demenza: la malattia di Alzheimer); si osserva inoltre anche una **ossidazione** di lipidi e proteine;

- la perdita neuronale però **non è omogenea**, infatti si perdono molti neuroni nelle zone di controllo motorio (sostanza nera e locus coeruleus), mentre la perdita è più variabile (minore) nel sistema limbico (apprendimento, memoria, emotività); quindi la vera demenza senile non è legata a processo di invecchiamento ma a processi patologici associati. Infatti un individuo può arrivare benissimo in età molto avanzata e mantenere intatte le sue attività cerebrali e l'intelligenza. Si ha invece perdita delle funzioni cerebrali quando l'invecchiamento è associato a processi come l'aterosclerosi che può determinare problemi nella circolazione cerebrale, o a causa di accumulo di placche amiloidi (malattia di Alzheimer). Ma queste sono malattie, **non** invecchiamento: sono malattie che possono comparire con l'età avanzata, ma che non sono coinvolte necessariamente nel processo di invecchiamento.

- l'invecchiamento causa quindi un calo delle funzioni motorie, ma fino a tarda età ci può essere un aumento dei dendriti, e ciò permette solo moderate diminuzioni della memoria e delle capacità intellettive (per mantenere lucida la mente è necessario mantenerla allenata, semplicemente ad esempio mantenendo degli interessi)

Ipotesi del declino del sistema immunitario

- Questa ipotesi è supportata dal fatto che con l'età si osserva:

â—¦ comparsa di **autoanticorpi** (che determinano reazioni autoimmuni, perché riconoscono elementi self);

â—¦ **ridotta capacità di risposta contro antigeni**;

- Tuttavia lo studio sui centenari sani ha dimostrato che la **risposta T è ben conservata**, infatti nonostante l'involuzione del timo gli anziani hanno molti linfociti T vergini (linfociti che non hanno mai incontrato l'antigene e quindi sono pronti a reagire in caso di ingresso di patogeni).

- Effettivamente c'è una riduzione dei linfociti B circolanti (forse per migrazione in organi periferici) e un'aumentata produzione di anticorpi, per lo più contro antigeni self (autoanticorpi), però questo **non** determina una riduzione delle capacità difensive dell'organismo. Specialmente l'immunità innata è ben mantenuta (cellule NK sono molte e funzionano, come anche i monociti). Ciò che in realtà viene a mancare nell'anziano è la regolazione del sistema immunitario, ovvero la produzione di citochine. Secondo gli studi effettuati infatti non si può dire che questa autoimmunità sia effettiva causa di invecchiamento né che con l'invecchiamento si assista ad una diminuzione della capacità dell'organismo di difendersi.

- La sintesi di citochine da parte dei linfociti (e di altri leucociti) è alterata negli anziani (ciò può comportare alterazioni della emopoiesi, della risposta immunitaria, della sopravvivenza cellulare e causare turbe neuroendocrine).

Glicazione delle proteine

- Reazione secondo la quale il glucosio si va a legare direttamente (senza enzimi) ai gruppi aminici delle proteine. Questo processo determina un'alterazione della funzione delle proteine e tende ad aumentare con l'età;

- la glicazione è accelerata e aumentata da eccesso calorico (introduzione di molti zuccheri) e in caso di diabete;

- la glicazione causa un'alterazione della funzione proteica:

â—¦ **Modificazioni del collagene** (si indurisce e perde la sua elasticità) con perdita di elasticità di articolazioni, arterie, glomeruli, cute, polmoni (da cui enfisema, arteriosclerosi, rigidità articolare, ipertensione);

-L'<u>enfisema</u> è uno stato in cui il polmone resta in dilatazione e quindi resta rigonfiato (provoca la tipica forma del torace a botte negli anziani). é determinato da un'alterata elasticità del tessuto polmonare, che quindi nella fase di espirazione non riesce ad espellere tutta l'aria per il mancato ritorno elastico. Quest'aria resta intrappolata negli alveoli determinando il rigonfiamento del polmone. (il contrario dell'enfisema è l'<u>atelectasia</u>, che appunto è uno sgonfiamento del polmone. Si presenta ad esempio nello pneumotorace, dove l'entrata di aria tra le due pleure provoca un loro distacco, e il polmone non è più mantenuto in dilatazione, quindi si sgonfia.);

- L' <u>arteriosclerosi:</u> termine generale che indica un indurimento delle arterie (a causa dell'indurimento del collagene e quindi del connettivo); è caratterizzata dalla presenta di tre quadri: 1) aterosclerosi

2) arteriolosclerosi

3) sclerosi calcifica mediale (della tonaca media delle arterie);

â—¦ **Alterazioni del cristallino** (cataratta): un tempo si pensava fosse un danno da ossidazione; si è invece dimostrato che è data dalla glicazione delle proteine del cristallino.Si presenta infatti spesso nei diabetici nei quali si osserva spesso anche una grave vasculopatia (o angiopatia diabetica) soprattutto a livello dei vasi periferici, determinata da aterosclerosi e trombosi a causa dello zucchero nei vasi.

â—¦ **Alterazioni cromosomiche**;

â—¦ **Alterazioni nella replicazione cellulare**.

La glicazione è un processo molto complicato secondo il quale gli zuccheri vengono legati al gruppo aminico delle proteine e poi attraverso la formazione di basi di Schiff e altri processi si viene a formare un legame intermolecolare (tra due molecole) dando luogo ad aggregati proteici chiamati **AGE** (Advanced Glication Endproducts). Questi legano recettori specifici sui macrofagi, cui segue fagocitosi con conseguente produzione di citochine, tra cui IL-1 e TNF, e stimolazione alla proliferazione di endoteli, fibroblasti, linfociti (l'infiammazione contribuisce all'invecchiamento).

â—¦ Glicazione delle LDL comporta diminuito legame delle LDL ai recettori e mancato blocco della sintesi del colesterolo;

â—¦ La glicazione delle membrane basali comporta il legame di Ig, albumina, LDL (che restano intrappolate nelle membrane) con ispessimento (glomerulonefrite, ovvero alterata filtrazione glomerulare, e arteriosclerosi).

Ipotesi della programmazione

L'ipotesi della programmazione sostiene che ci sia un programma genetico, che impedisce ad un certo punto alla cellula di replicarsi.

- **ESPERIMENTO DI HAYFLICK**:i fibroblasti umani stimolati a riprodursi in vitro possono fare circa 50 passaggi (con passaggi si intende il trasferimento di cellule in eccesso da un piano di coltura ad un altro, e non 50 replicazioni!! Dunque il numero di replicazioni rimane non quantificato) poi non si replicano più: questo potrebbe essere determinato da danneggiamento, o per presenza di un programma che controlla la replicazione.

- Se prendo i fibroblasti da un adulto o da un anziano ho meno passaggi che se li prendo da un embrione o da un bambino, quindi con l'età esiste qualcosa che determina quanto le cellule possono replicarsi (sarebbe quindi un programma!).

- Se trapianto i nuclei di cellule già proliferate, la cellula trapiantata si divide per un numero di volte che dipende da quanti passaggi ha fatto la donatrice (es. se trapianto il nucleo di una cellula di bambino nella cellula di un anziano), dunque se esiste un **orologio biologico** questo si trova nel nucleo. In più le cellule dei soggetti con progeria si comportano come quelle di un anziano.

Questo porta a pensare che c'è un orologio biologico che determina quante replicazioni farà quella cellula e a un certo punto le cellule esauriscono questo programma e quindi non vanno più a sostituire le cellule morte e/o danneggiate e ci sono più cellule danneggiate rispetto alle morte *(suppongo volesse dire sane, NdR)* e si invecchia.

ñ Non tutte le cellule sono sottoposte in ugual modo all'invecchiamento, perché nell'organo di un individuo si possono distinguere una quota di cellule invecchiate, e una quota di cellule non invecchiate.

Le cellule tumorali sono immortali

- Le cellule tumorali sfuggono alla programmazione, quindi non presentano un orologio biologico, o in qualche maniera l'hanno ingannato.

- Con immortalità si intende una capacità replicativa infinita, e non una reale immortalità di queste cellule. (Tra le cellule tumorali utilizzate ora in laboratorio vi sono cellule isolate 50 anni fa che continuano a replicarsi come se fossero giovani)

- alla base dell'immortalizzazione c'è:

â—¦ **mancata sintesi di proteine inibitrici** (es. P53, Rb1) della proliferazione cellulare (prodotti di antioncogeni);

â—¦ mancato accorciamento dei telomeri grazie alla presenza della **telomerasi** (enzima presente solo in cellule neoplastiche e nelle cellule germinali).

- Esiste nelle cellule normali un orologio biologico che regola la capacità di divisione cellulare, e l'invecchiamento potrebbe derivare dall'incapacità di sostituire le cellule morte (possibile ruolo dell'accorciamento dei telomeri, che quando raggiunge punto critico determina un'incapacità della cellula di effettuare ulteriori replicazioni; però è stato osservato che nei topi non c'è accorciamento telomeri, anzi topi invecchiano anche se presentano telomeri molto lunghi.)

- Alla morte dell'individuo però le cellule non hanno esaurito la capacità di dividersi, quindi nell'invecchiamento non può essere implicato solo l'accorciamento dei telomeri.

- Ai telomeri si associano delle proteine, delle quali si hanno poche conoscenze quindi ci potrebbero essere delle possibili implicazioni nel deterioramento dei telomeri. Inoltre le proteine associate ai telomeri possono andare incontro ad ossidazione, anche questo può contribuire all'invecchiamento.

Teoria ormonale

- Gli ormoni regolano il funzionamento, ma anche la vitalità dei tessuti con effetti anabolici (es. ipofisi, ovaie, testicoli), infatti la privazione di ormoni e fattori di crescita comporta apoptosi e atrofia;

- Nell'invecchiamento insorgono la menopausa e la andropausa (che corrispondono a un calo di ormoni maschili e femminili), che sono causa di diminuzione della massa ossea, atrofia della cute, anemia (diminuzione dei globuli rossi), alterazioni cognitive, causano dunque aumento dell'invecchiamento. Da questo ne deriva che gli ormoni hanno un ruolo nel mantenere giovani le cellule;

- La somministrazione di ormoni (GH, estrogeni) aumenta la massa ossea, muscolare, lo spessore della cute;

- Inoltre esiste una connessione tra il sistema endocrino e il sistema nervoso (stress, regolazione dell'umore);

- Sette/ otto anni fa è stato fatto uno studio collegato a questa teoria che ha fatto scalpore: è stato fatto un esperimento epocale riguardante gli ormoni insulina e IGF-1; si è visto che diminuendo il segnale dell'insulina e dell'IGF-1 si può raddoppiare la vita di C. Elegans ma anche della Drosophila;

INSULINA e IGF-1 sono due ormoni che hanno la medesima funzione, quella di far entrare lo zucchero nella cellula in modo da permetterle la produzione di energia necessaria per la crescita, la replicazione ecc della stessa. Si noti come questi due ormoni siano presenti sostanzialmente in tutte le specie con la differenza che mentre nei nematodi e negli insetti questi si legano ad uno stesso recettore (hanno cioè un recettore in comune), nell'uomo e nel topo si legano a due recettori diversi. L'insulina è un ormone che viene prodotto in seguito ai pasti, ma anche solo quando si sente l'odore del cibo, in modo che il nostro corpo possa prepararsi all'arrivo degli zuccheri.

Durante lo sviluppo embrionale se si stimola un topo con IGF-1, questo avrà dimensioni maggiori, mentre se si riducono i recettori per l'IGF-1, questo avrà dimensioni minori. Sembra che la differenza tra cani di piccola e grande taglia sia determinata dalla produzione di diverse quantità di IGF-1. (Ecco cone lo sviluppo delle specie possa essere anche legato in gran parte a questo stimolo insulinico);

Si è inoltre fatto un'ulteriore studio sul topo in cui si è visto che sia che io diminuisca il cibo, sia che io diminuisca il livello di insulina e IGF-1 la lunghezza della vita del topo aumenta! Tutto questo prova quanto sia fondamentale la nostra dieta nel processo di invecchiamento dal momento che esiste una effettiva connessione tra alimentazione e lunghezza della vita. (alimentazione strettamente connessa all'insulina e insulina strettamente connessa con la longevità).

- In Drosophila, ma anche in C. Elegans, è stato osservato che quando l'insulina si lega al proprio recettore (codificato dal gene DAF-2) viene inibito un altro gene, DAF-16, che codifica per un fattore di trascrizione che si chiama **FOXO**. FOXO migra nel nucleo ed è responsabile della trascrizione di una serie di geni con funzione antiossidante (es. geni per proteine SOD e catalasi, ma anche geni chaperon , geni di resistenza a stress e malattie, geni che promuovono turnover delle proteine. Questi sono tutti geni che determinano un allungamento della vita). Dunque l'insulina è responsabile nell'impedire la trascrizione di questi geni e ne consegue quindi che la diminuzione di recettori per l'insulina o la restrizione calorica (che determina un calo di produzione di insulina) aumentano la liberazione di FOXO, aumentando quindi la longevità.

Sembra un paradosso: tolgo l'energia e l'animale vive di più? No- si tratta di diminuire, non di bloccare totalmente o eliminare l'insulina; si mantiene semplicemente l'alimentazione ad un giusto livello. La condizione per l'allungamento della vita è la riduzione del recettore dell'insulina (eterozigote), mentre la totale mancanza è causa di malattia, ovvero di diabete (omozigote).

Nell'uomo e nel topo non sono state isolate proteine analoghe a FOXO, però è stato provato che esiste una via analoga.

É stato anche scoperto che il **gene age-1** codifica per una proteina chinasi che fosforila il FOXO, inattivandolo.

É stato osservato che in topi sottoposti a **shock termico**, questo determinava un aumento della longevità causato dalla liberazione della proteina HSF-1 (heat shock factor-1). Quest'ultima infatti collabora con FOXO per la sintesi delle proteine chaperon che proteggono le altre proteine dallo stress.

FOXO è anche responsabile della protezione contro i tumori, dunque la nostra alimentazione risulta importante oltre che per l'invecchiamento anche per la tumorigenesi.

Nel lievito è stata scoperta il **gene *sir-2*,** che viene espresso quando l'organismo è sottoposto a restrizione calorica (per restrizione calorica non si intende una privazione di cibo, ma una dieta bilanciata rispetto al consumo calorico). La proteina prodotta,SIR-2, determina l'attivazione della deacetilasi di FOXO, che causa la sua attivazione. Nell'uomo è stato individuato un analogo della proteina SIR-2 che si chiama SIR T1.

Se in C. Elegans vengono rimosse le **cellule germinative**, questo determina l'allungamento della vita del nematode (rimozione delle cellule germinative associata a diminuzione dei recettori DAF-2 determina un aumento di 5 volte la vita del nematode). Quindi anche gli organi riproduttivi presentano un ruolo nell'invecchiamento.

- Il collegamento che è stato effettuato tra alimentazione, apparato riproduttivo e lunghezza della vita ha portato all'elaborazione di un'ipotesi, che deve però ancora essere provata. Infatti secondo alcuni quando un organismo si trova in un ambiente ostile (es. heat shock), si attivano in lui dei meccanismi volti all'allungamento della sua vita, che gli permettono di avere la possibilità di andare alla ricerca di un ambiente meno ostile per potersi riprodurre, e permettere la sopravvivenza della propria prole.

- Alcuni sostengono che la durata della vita è limitata nel tempo, perché se l'uomo riuscisse a vivere fino a 200 anni, questo tempo sarebbe così lungo da causare con alta probabilità l'accumulo di mutazioni tale da causare l'insorgenza di tumori.

- Nel topo è stato osservato inoltre che la riduzione di recettori dell'insulina nel fegato provoca diabete, mentre la riduzione di recettori per l'insulina nel tessuto adiposo determina un aumento della longevità. Stesso recettore in diversi ambiti può avere dunque diversa importanza.

Teoria evolutiva

- Secondo questa teoria l'evoluzione ha previsto geni e strutture (materiale di riserva, sistemi riparativi, rigenerativi, ecc...) che servono a mantenere il corpo in efficienza per circa 40 anni, cioè fino alla fine del periodo riproduttivo. Poi il corpo non serve più e viene lasciato eliminare dallo stress ambientale (teoria del “soma usa e getta”).

Malattie da invecchiamento precoce

- **SINDROME DI WERNER**: è una malattia autosomica recessiva causata dalla mutazione di un gene che codifica per un'elicasi della famiglia RecQ. Quest'elicasi è implicata nella riparazione e/o replicazione del DNA e nel controllo delle sequenze telomeriche e quando mutata causa quindi un'instabilità genomica, accumulo di mutazioni, e instabilità dei telomeri. Questa sindrome si concilia con la teoria genetica dell'invecchiamento e con la teoria da Hayflick. Il quadro clinico di questa patologia è caratterizzata da perdita di capelli, atrofia cutanea, malattia cardiaca precoce, neoplasie. Non esistono terapie.

- **PROGERIA (o malattia di Hutchinson-Gilford)**: malattia che deriva dalla mutazione del gene per le lamine A e C, che sono delle proteine fibrillari localizzate sulla membrana nucleare. La loro funzione fisiologica è ancora poco chiara, probabilmente sono coinvolte con il traffico della membrana nucleare. Nel 90% dei casi la malattia è causata dalla mancanza di 50 aminoacidi al C-terminale della lamina A. In questa patologia si osserva accorciamento dei telomeri, secondo alcuni causato da un fenomeno ossidativo, anche se rimane solo un'ipotesi. Il quadro clinico consiste nella comparsa di alopecia (perdita di peli e capelli), atrofia della cute e dello scheletro, aterosclerosi accelerata.

- Queste malattie in realtà riproducono alcuni aspetti dell'invecchiamento, ma non riproducono un vero e proprio invecchiamento accelerato (considerazione del professore).

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 24/10/2012

Jacopo Fantinati

Lezione di patologia generale e fisiopatologia clinica tenuta in data 24-10-2012 dal Prof. Cassatella

Corso: infiammazione e oncologia della cellula

Lezione introduttiva sulla flogosi

-

-

Concetti generali e fondamenti di immunologia

L'infiammazione è un aspetto della patologia fondamentale e sta alla base di gran parte delle patologie, sia direttamente sia indirettamente. Esiste sempre in ambito patologico un aspetto che riguarda l'infiammazione, tant'è vero che qualche anno fa, nel 2002-2003, la copertina del "Time" titolò che **l'infiammazione può essere collegata anche ai tumori**. Un aspetto cruciale della crescita neoplastica è infatti che può essere legata e condizionata da una serie di aspetti della reazione infiammatoria. Oggi questo concetto è molto studiato nell'ambito della ricerca.

Il processo infiammatorio

Cominciamo con il definire cos'è il **processo infiammatorio**. Esistono tantissime definizioni; la più comune è: **risposta reattiva locale ad un agente o a una situazione che provoca un danno in qualsiasi sede dell'organismo**.

Quindi l'infiammazione rappresenta la **risposta a un danno**, e tale risposta può avvenire **ovunque**. Essa ha ovviamente aspetti positivi, ma nel momento in cui si scatena essa stessa può a sua volta diventare causa di danno, perché lo amplifica se non controllata dai sistemi di regolazione.

L’infiammazione è un **sistema reattivo aspecifico** che reagisce in maniera stereotipata, soprattutto nelle prime fasi; successivamente, a seconda delle variabili (causa del danno, sede corporea interessata, altri fattori…) evolve con diverse modalità.

L’infiammazione non è l'unico processo di risposta a una situazione di danno e di pericolo; possono intervenire, per esempio, anche il sistema endocrino, e quindi la liberazione di ormoni; il sistema nervoso centrale e periferico; sistemi cellulari e acellulari. Il tutto coopera per mantenere un equilibrio a livello locale. In sintesi questi sistemi mantengono **l’omeostasi**. Se quest’ultima si altera per un danno, tali sistemi intervengono.

Questi sistemi possono essere **specifici** o **aspecifici**. La risposta infiammatoria si inquadra nell’ambito dei processi aspecifici; nell'ambito specifico vengono invece coinvolti tutti i sistemi che danno una risposta immunitaria adattativa specifica diretta contro un agente eziologico, per esempio un antigene specifico dotato di una serie di caratteristiche peculiari.

L'infiammazione si può definire anche come **la reazione di un tessuto e della microcircolazione dovuta a un insulto antigenico**. Dove scatta all'inizio questa risposta? Nella microcircolazione. Essa si caratterizza per la generazione di mediatori infiammatori e di un movimento di fluidi e leucociti dal sangue verso i tessuti extravascolari.

(VEDI FIGURA)

Per es. un danno muscolare viene riconosciuto e genera una serie di mediatori infiammatori; tali mediatori infiammatori chimici a loro volta saranno responsabili delle risposte generate.

Nel caso di una risposta infiammatoria acuta questi mediatori chimici a livello della microcircolazione innescano **immediatamente** una serie di meccanismi e risposte che favoriscono la fuoriuscita di liquidi e cellule dal sangue verso i tessuti. I leucociti, i globuli bianchi del sangue, sono chiamati a svolgere funzioni prettamente difensive. Per riassumere, l'infiammazione coinvolge: **microcircolo, cellule e i sistemi plasmatici polimolecolari solubili**, che sono altri protagonisti della risposta infiammatoria.

La catena di eventi della risposta infiammatoria

La risposta infiammatoria inizia con molecole che riconoscono qualcosa di **estraneo**, che **in genere** è anche **pericoloso**. Qualsiasi insulto viene percepito come segnale di pericolo, e al pericolo si risponde attraverso la generazione di mediatori chimici, la cui espressione varia a seconda della causa, dell’ organo interessato, ecc. Possiamo riassumere schematicamente la catena di eventi in questo modo:

induzione del danno > percezione di questo danno provocato dall’ induttore > attivazione dei mediatori > induzione di una risposta effettrice contro l'agente induttore

Gli induttori, ossia le diverse cause che possono attivare la risposta infiammatoria, sono rappresentati sia da causa esogene che da cause endogene.

Induttori esogeni ed induttori endogeni

Tra le cause **esogene** troviamo agenti microbici e agenti non microbici. Questi induttori possono esprimere i cosiddetti **PAMP**, ossia i “Profili Molecolari Associati ai Patogeni”.

I microbi attivano le risposte immunitarie perchè esprimono delle “signature” (*letteralmente “firme”, inteso come segni specifici di riconoscimento- NdR*), molecole che sono specifiche dei microbi, e che immediatamente vengono riconosciuti del sistema di riconoscimento attraverso recettori specifici. Essi possono esprimere anche i fattori di virulenza, molecole rilasciate che possono attivare la risposta immunitaria.

Tra gli agenti non microbici troviamo allergeni, sostanze che inducono una risposta allergica soltanto in individui **predisposti** a rispondere in una maniera anomala, scatenando una risposta infiammatoria acuta che può diventare cronica; sostanze esogene irritanti; ecc.

Esistono anche induttori **endogen**i che possono scatenare una risposta infiammatoria: essi possono derivare da cellule, da vari tessuti, dal plasma, dalla matrice extracellulare. Le cellule, durante la risposta infiammatoria oppure quando vengono danneggiate dalla causa scatenante di essa, possono rilasciare una serie di molecole e di sostanze che normalmente si trovano nel citoplasma e una volta rilasciate possono stimolare le cellule vicine. Quest’ultime esprimono recettori specifici, che molto spesso sono gli stessi che riconoscono anche i PAMP, e che quindi attivano le risposte infiammatorie. In alternativa, possono venire liberati enzimi che normalmente lavorano esclusivamente all'interno della cellula e quando vengono rilasciati all'esterno clivano tutto quello che trovano; essi pertanto possono a loro volta produrre danno, che ha come conseguenza una risposta infiammatoria e un'amplificazione della produzione di mediatori chimici infiammatori.

Le cause che possono produrre infiammazione **acuta** sono: infezione da parte di ogni tipo di batteri, tossine, traumi superficiali e profondi e una serie di cause chimiche, fisiche e biologiche, come per es. lesioni termiche, dovute all'aumento o alla riduzione repentina di temperatura.

Irradiazione, sostanze chimiche e corpi estranei in genere possono attivare una risposta infiammatoria **cronica**. A seconda delle dimensioni, se tali corpi estranei non sono eliminabili permangono in sede e si attua un **continuo tentativo di eliminarli**; se ciò non riesce, può risultare lo sviluppo di una infiammazione cronica che poi si manifesta con diversi e particolari aspetti che sono specifici per quanto riguarda i corpi estranei e sui quali possiamo far diagnosi facilmente.

La flogosi è coinvolta anche nell’ ambito delle reazioni immunitarie anomale, ossia le reazioni di ipersensibilità, alla cui base vi è proprio una risposta infiammatoria cronica.

La necrosi è un fenomeno molto pericoloso. Può essere per esempio causata da un infarto, ossia un blocco della circolazione che provoca la morte di un tessuto, e può essere essa stessa causa di una risposta infiammatoria perché le cellule morte rilasciano numerose sostanze intracellulari che attivano i meccanismi di danno e amplificano la risposta infiammatoria

(VEDI FIGURA)

Polveri di metalli: l’inalazione di queste polveri induce **patologie infiammatorie croniche** soprattutto **a livello respiratorio** che si definiscono **pneumoconiosi**.

I cristalli di urato possono causare una **malattia infiammatoria acuta**: la **gotta**.

Inizialmente il pericolo delle protesi era quello che venivano riconosciute come sostanze estranee e si scatenavano delle risposte immunitarie contro di esse.

Funzioni della risposta infiammatoria acuta

La risposta infiammatoria si innesca per svolgere determinate funzioni. Nel caso di una risposta infiammatoria acuta la zona interessata dal danno viene occupata da un materiale composto da liquido e cellule che prende il nome di **essudato** (il nome completo è **essudato infiammatorio**). Questo materiale è costituito da una gran quantità di **proteine, fluidi e cellule** che derivano dal sangue e sono migrate dai vasi nell’ area danneggiata. Esso svolge una **funzione difensiva a livello locale**.

Qualsiasi danno, indipendentemente dal fatto che sia causato da un agente patogeno o no, viene percepito dal nostro organismo come se ci fosse un pericolo di infezione; quindi la risposta infiammatoria acuta viene utilizzata per cercare di **eliminare** questo **ipotetico agente effettivo**, anche se in realtà non è presente; in seguito il processo continua in maniera stereotipata.

I patogeni proliferano velocemente e quindi è importantissimo che questi sistemi vengano attivati **subito** per evitare che i patogeni prendano il sopravvento. Nel caso in cui la causa sia rappresentata da agenti infettivi, per esempio batteri, allora il significato della risposta infiammatoria acuta è quello di richiamare fluidi e cellule affinché queste sostanze eliminino questi agenti.

Questo è quello che succede classicamente durante la risposta infiammatoria (VEDI FIGURA 3.5): abbiamo un danno a un tessuto, per es. la puntura con una spina, e a questo danno si sovrappone molto facilmente una infezione; questo danno tissutale viene riconosciuto e causa la produzione di **mediatori chimici**. Ci sono tantissimi mediatori chimici, dotati di funzione vasoattiva e chemotattica. Essi stimolano un **aumento del flusso sanguigno a livello locale** e un **aumento della permeabilità** e favoriscono la **fuoriuscita di liquidi** dai vasi ai tessuti; tali liquidi contengono materiali, proteine o sistemi polimolecolari solubili, molto importanti per le azioni difensive. Questi mediatori stimolano anche la **extravasazione delle cellule** verso i tessuti.

Normalmente il primo tipo cellulare a essere reclutato è rappresentato dai **neutrofili**, specializzati nella fagocitosi e nella produzione di sostanze fortemente tossiche per i batteri patogeni. Se questo meccanismo funziona l'invasione viene bloccata.

La risposta infiammatoria acuta rientra **nell'immunità innata**. L'infiammazione costituisce la risposta a un danno che serve per richiamare in maniera rapida, veloce e tempestive cellule e sistemi molecolari in modo da poter **eliminare**, se possibile, l'agente eziologico, o in alternativa a **tamponare** le fasi iniziali dell'infezione per dare il tempo all' immunità specifica adattativa di svilupparsi.

L'immunità adattativa infatti **è più efficace e più potente** di quella innata, che è un sistema aspecifico. L'immunità specifica invece, tramite la produzione di anticorpi e linfociti T effettori, è in grado di colpire e sconfiggere lo specifico bersaglio .

(VEDI FIGURA)

Una volta sviluppatasi l'immunità specifica, verranno prodotte anche le cellule di memoria. Nell'individuo esposto allo stesso patogeno per una seconda volta, grazie alle cellule di memoria si può sviluppare una risposta immunitaria secondaria più efficace. Questa è la base della **vaccinazione preventiva**: preparare un individuo a rispondere a un agente patogeno in maniera immediata, fornendolo di una immunità specifica contro di esso.

(Rivedere la slide dell'Abbas, che elenca le differenze tra risposte innate e adattative) NOTA BENE

La risposta infiammatoria ha un significato difensivo, ma ha anche il ruolo di rimuovere il tessuto danneggiato e sostituirlo per ritornare alle condizioni iniziali : la guarigione, la **restitutio ad integrum**.

La risposta infiammatoria può servire a localizzare l'infezione, a prevenire la diffusione dell'agente patogeno, a eliminare l'agente patogeno, a favorire meccanismi di riparazione e guarigione.

Alternativa definizione di infiammazione: **l'insieme dei meccanismi basici disponibili per la riparazione di un tessuto dopo un danno, rappresentati dalle cascata di reazioni cellulari e microvascolari che servono a rimuovere il tessuto danneggiato, dopo aver eliminato la causa**.

Le cellule coinvolte nei meccanismi immunitari

I mastociti sono cellule presenti solo transientemente nel sangue; sono cellule tipicamente **tissutali**, che **non** derivano dai basofili.

Le cellule dendritiche **ci sono eccome** nel sangue, e attraverso esso arrivano ai tessuti.

Normalmente i leucociti nel sangue sono: **5000-10000/millimetro cubo o microlitro**

(N.B: 1 MILLIMETRO CUBO = 1 MICROLITRO)

Di questi leucociti abbiamo, in %:

-granulociti: dal 40-70 %

-linfociti: dal 20-40%

-monociti: 7-8 %, max 10%

-cellule dendritiche (nel sangue): max 1-2 %

Le cellule dendritiche sono monociti, sono cellule mieloidi. Ci sono tante sottopopolazioni diverse di dendritiche. Acquisiscono le caratteristiche del tessuto in cui risiedono e successivamente maturano.

-cellule NK (sono linfociti): 5-10 % dei linfociti

Intervengono nel processo infiammatorio anche gli endoteliociti, importanti per funzioni che svolgono nella microcircolazione, e le cellule del tessuto interessato dall'infiammazione.

I mastociti sono cellule prevalentemente tissutali.

I macrofagi derivano dai monociti.

Nel sangue c'è anche una piccolissima % di cellule staminali, che possono anche essere isolate.

I globuli rossi sono: 4-6 milioni per microlitro.

(APPROFONDIMENTO - NdR:

valori normali medi delle cellule ematiche, secondo Abbas:

-globuli bianchi: 7400 / microlitro

Di questi:

-neutrofili: 4400

-eosinofili: 200

-basofili: 40

-linfociti: 2500

-monociti: 300)

Le molecole coinvolte nell'infiammazione

I sistemi polimolecolari solubili includono il **sistema del complemento**, il **sistema delle chinine**, **della plasmina** e **della coagulazione**. Essi sono composti da una serie di proteine che normalmente sono in stato inattivo. Quando c'è un danno si attivano perché si liberano enzimi che clivano un componente a monte che, una volta tagliato, acquisisce attività enzimatica e va a clivare e ad attivare a sua volta una componente a valle: meccanismo **a cascata**. Uno specifico stimolo va per es. ad attivare il complemento; i mediatori del complemento vanno a loro volta ad attivare tutti gli altri sistemi. Vi è una **connessione** in ogni momento tra questi sistemi, e il tutto si **autoamplifica**. Una volta che si attiva un sistema, si attivano anche tutti gli altri.

I mediatori chimici sono derivati sia da tali sistemi polimolecolari solubili, sia sono genarati dalle cellule stimolate. I mediatori chimici sono molecole di segnalazione. Tali molecole sono **in grado di riprodurre uno specifico fenomeno e funzione: ciò che fanno in vivo durante la risposta infiammatoria deve essere dimostrato in vitro**.

I mediatori sono derivati dai sistemi polimolecolari solubili del plasma e dell'interstizio o da cellule. Classifichiamo i mediatori derivati da cellule così:

-mediatori **preformat**i, tenuti in compartimenti intracellulari chiusi e che la cellula, una volta stimolata, rilascia nel giro di **pochi secondi**

-mediatori **neoformati rapidamente**: la cellula stimolata attiva specifici enzimi intracellulari quiescenti, che cominciano a lavorare e nel giro di **secondi o minuti** producono mediatori che quindi vengono rilasciati.

Fanno parte di questi:

â—• tutti i derivati dell'acido arachidonico. Quando è presente si trova legato in posizione 2 nei fosfolipidi di membrana, e viene rilasciato per azione dell'enzima fosfolipasi A 2; può funzionare esso stesso come mediatore ma può anche essere metabolizzato all'interno della cellula e, a seconda del tipo di cellula e quindi degli enzimi ivi espressi e dal tipo di stimolo, può generare una serie di composti che influenzano l'infiammazione (prostaglandine, trombossani, leucotrieni)

â—• enzimi che producono radicali liberi dell'azoto e dell'ossigeno e che sono molto tossici per i batteri: se la loro produzione non è però adeguatamente controllata, essi possono anche danneggiare le cellule vicine, così come provocare infiammazione, oltre che, se attivati cronicamente, determinare mutazioni e quindi anche lo sviluppo di tumori (**link: infiammazione-tumori**)

-mediatori **a formazione lenta**: la loro produzione richiede **ore**, poiché vengono prodotti solo dopo l' attivazione dell' espressione genica; ciò comporta tutta una serie di eventi e passaggi molecolari di sintesi che richiedono tempo e che possono essere finemente regolati dagli stimoli infiammatori. Tali molecole sono rappresentate per es. dalle citochine o dalle molecole di adesione.

(VEDI FIGURA PATOGENESI)

I mediatori chimici, una volta prodotti, legano e attivano i recettori bersaglio: ciò induce la formazione di risposte ed eventi cellulari clamorosi. Si attivano funzioni cellulari specifiche, enzimi, inizia la produzione di altri mediatori: si verifica quindi un **meccanismo di amplificazione della risposta** incredibile.

Tali mediatori hanno quindi un' azione **positiva** nei circuiti sintetici infiammatori; tuttavia si attivano contemporaneamente anche altri mediatori con attività speculare e che hanno un effetto **negativo**, con azione di controllo delle varie fasi. **La patologia può nascere quindi o da un eccesivo segnale positivo o dalla mancata regolazione da parte di mediatori negativi**, che noi chiamiamo antiinfiammatori.

Tutte queste risposte cambiano a seconda delle caratteristiche biologiche del'individuo, quali età, background genetico, contesto ambientale; ciò può alterare la produzione di tali mediatori e causare infine patologia.

Modello di manifestazione della risposta infiammatoria acuta e

cenni sulla differenza tra infiammazione acuta e cronica

Un agente infettante crea un danno in un organo; si attiva una risposta duplice: **vascolare** e **cellulare**, che insieme formano l'**essudato**, il quale rappresenta il **materiale specifico dell'infiammazione acuta**.

La **risposta vascolare** legata alla produzione di mediatori determina:

-iperemia attiva, ossia un aumento del flusso sanguigno a livello locale e dilatazione dei vasi

-iperemia passiva, ossia un rallentamento del flusso per accumulo del sangue

-aumento della permeabilità vascolare, che è un evento che dipende da diversi fattori e solo parzialmente dall'iperemia; tale aumento favorisce la fuoriuscita di proteine e dei sistemi polimolecolari solubili del sangue nei tessuti

La **risposta cellulare** è caratterizzata dalla **migrazione dei leucociti dal sangue ai tessuti**, che **non è assolutamente legata al cambiamento di permeabilizzazione ma da un'altra serie di eventi**.

Classicamente, indipendentemente dalla causa, a parte qualche eccezione, il primo tipo cellulare a fuoriuscire dai vasi sono i neutrofili.

La flogosi cronica è **un altro fenomeno**. La divisione tra le due **non** è in base alla **durata**, ossia che una dura poco e l'altra tanto. Effettivamente l'acuta dura poco e la cronica tanto, ma la differenza fondamentale riguarda la **biologia** del fenomeno. La acuta si caratterizza per suoi peculiari aspetti, mentre la cronica assume, dal punto di vista biologico, caratteristiche **diverse e distinguibili**. Spesso l'infiammazione cronica segue quella acuta, ma ciò non è sempre vero. Esistono flogosi croniche che si manifestano biologicamente come tali fin dall'inizio, o per lo meno sarà avvenuta una flogosi acuta che non si è stati in grado di cogliere; per es. infezioni virali.

(VEDI FIGURA)

La microcircolazione è costituita dalle arteriole terminali e dalle venule capillari.

(VEDI FIGURA)

Questi eventi spiegano i classici sintomi descritti da Celso (primo secolo d.C.) tipici dell' infiammazione acuta; secondo Celso i **segni cardinali** dell'infiammazione acuta sono: rubor, calor, dolor e tumor.

Rubor: rossore, è dovuto a iperemia: il maggior apporto di sangue provoca un arrossamento della regione; in seguito il colore diventerà tendente al violetto per accumulo localizzato prolungato di sangue

Per es.: scottature, esposizione prolungata al sole, cellulite (infezione acuta del sottocutaneo), congiuntivite

Calor: calore, anch'esso dovuto al maggior afflusso di sangue caldo nella zona specifica; è dovuto specialmente a iperemia attiva e si percepisce solo nelle parti periferiche del corpo, quali la pelle. L'aumento della temperatura può anche essere legata allo sviluppo di febbre, ma questo è un fenomeno a parte dovuto alla produzione di specifici mediatori chimici

Dolor: dolore, causato dalla fuoriuscita di liquido che può interferire, non è detto che lo faccia sempre, con la funzionalità delle cellule adiacenti

Tumor: tumefazione, causata dalla fuoriuscita di cellule e liquidi, che compongono l'essudato

A questi segni cardinali si aggiunge la **functio laesa**. Tale aggiunta è attribuita a Virchow (1821-1902), studioso che mise a punto modelli in vitro per definire le caratteristiche della risposta infiammatoria acuta.

Functio laesa: se l' infiammazione è grave e colpisce determinati organi può causare perdita di funzione, legata al danno o per es. a impedimento meccanico (per es. immobilizzazione di un arto infiammato)

La tumefazione risulta dall'**edema**.

Edema è un termine generale che indica un **accumulo di liquido nello spazio extravascolare**. A seconda della composizione di questo liquido, l'edema si suddivide in **trasudatizio**, che consiste in aumento del liquido extravascolare che possiede le

caratteristiche normali di quello specifico tessuto, ed **essudatizio**, che ha invece le caratteristiche tipiche del plasma, ossia è molto ricco di proteine.

L' edema infiammatorio è essudatizio, il trasudatizio è legato a varie cause indipendenti dalla risposta infiammatoria.

(VEDI FIGURA)

Per il paziente il dolore è una delle caratteristiche più facilmente riconosciute. Può risultare in parte dalla distorsione e stiramento del tessuto dovuto all' edema, ma è soprattutto legato alla produzione di mediatori chimici come la bradichinina, le prostaglandine, le serotonine, prodotti durante la risposta infiammatoria e che sono in grado di stimolare le terminazioni nervose.

Manifestazioni dell'infiammazione

a livello sistemico

Quelle trattate fino ad ora sono considerate risposte infiammatorie **locali**. Durante infiammazioni acute di una certa gravità ci possono anche essere **manifestazioni cliniche**: malessere generale, febbre, dolore (spesso localizzato nell'area dell'infiammazione), aumento della frequenza cardiaca. Questi sono una serie di **sintomi generali** che indicano infiammazione acuta.

Esistono anche alcuni parametri di laboratorio, ovviamente molto più precisi, utilizzati per diagnosticare un'infiammazione acuta, e che possono persistere in un'infiammazione cronica. Classicamente si trova:

-aumento del numero dei neutrofili nel sangue (**neutrofilia** o **granulocitosi**): invece di trovare 4000-7000 neutrofili per microlitro, se ne possono trovare 10000-20000, il che indica una probabile infezione e quindi infiammazione. Il numero dei neutrofili aumenta così tanto perché i neutrofili sono cellule che vivono poco ed è necessario un continuo rifornimento di tali cellule per mantenere il ritmo di proliferazione dei batteri; si scatena quindi la produzione di fattori di crescita del midollo che ne stimolano la produzione

-aumento della VES: velocità di eritrosedimentazione (vedi oltre)

-aumento della concentrazione (fino anche a 30000 volte) **delle proteine di fase acuta del sangue**: normalmente esse sono presenti in bassissime concentrazioni, ma la loro quantità aumenta in maniera drammatica in seguito ad infiammazione acuta. Sono prodotte dal fegato e la loro produzione è indotta da alcuni mediatori come IL 1, oltre a tanti altri. Un es. di tali proteine è la proteina C reattiva e il fibrinogeno. Possono essere misurate per monitorare un processo infiammatorio. Tali proteine hanno un significato difensivo e sono in grado di agire, in cooperazione, con diversi meccanismi, per contrastare la proliferazione dei batteri: una sequestra il ferro, un'altra favorisce la fagocitosi, e così via. A causa di tale aumento di proteine, cambia di conseguenza la **viscosità** del sangue, per cui cambia anche la VES.

Quelli citati ora sono gli effetti **sistemici** dell' infiammazione acuta.

Manifestazioni dell'infiammazione

a livello locale

Come abbiamo già detto, gli effetti locali dell'infiammazione possono essere benefici, come la distruzione del patogeno, ma anche dannosi. La formazione dell' essudato permette infatti:

-la **diluizione delle sostanze tossiche**, visto che aumenta il volume del liquido

-la **fuoriuscita di proteine** come gli anticorpi

-l'**attivazione** e la **fuoriuscita del fibrinogeno**, che comporta la formazione di reti di fibrina che possono intrappolare gli agenti patogeni e favorire la loro fagocitosi e la loro uccisione tramite le sostanze chimiche tossiche

-la **fuoriuscita di sostanze nutritive e ossigeno**

-la **stimolazione della risposta immune** grazie alla migrazione delle cellule presentanti l'antigene ai linfonodi

-la **fuoriuscita di farmaci** proprio nella zona in cui è richiesta la loro azione

Risulta dannoso invece:

-il **rilascio degli enzimi lisosomiali** da parte soprattutto dei neutrofili, che possono digerire le cellule adiacenti normali e quindi aggravare il danno e la risposta infiammatoria

- il **rigonfiamento**, come, per es., in caso di infiammazione acuta dell' epiglottide, che ostruisce le vie respiratorie (per es. in caso di infezione da parte di batteri come l'Haemophilus) o in caso di edema cerebrale dentro la scatola cranica che, essendo inestensibile, può avere conseguenze drammatiche (per es. durante meningite acuta)

-**risposte** infiammatorie inappropriate come quelle **di ipersensibilità**: risposte allergiche, asma, shock, …

Evoluzione e risoluzione della risposta infiammatoria

acuta e cronica

La risposta infiammatoria acuta può **risolversi**, nel caso in cui i meccanismi di difesa siano stati in grado di eliminare la causa scatenante.

(VEDI FIGURA)

Per es. : un' infiammazione acuta che si risolve a livello polmonare: dapprima avviene l' invasione degli alveoli da parte dei neutrofili nella fase acuta; quindi, nel giro di pochi giorni, essi sono seguiti dai macrofagi e, se tutto va bene, il problema si risolve, con conseguente **ritorno alla normalità**. Tale processo peculiare e molto studiato nell' ambito della ricerca prende il nome di **"inflammation resolution"**, ossia "risoluzione dell' infiammazione acuta".

Se però la causa non viene eliminata, essa persiste nel tempo e si sviluppa infine infiammazione cronica. Essa è caratterizzata da bassissime quantità di neutrofili e presenza di altre cellule, come monociti, macrofagi e linfociti.

Esistono anche situazioni in cui l' infiammazione acuta cronicizza mantenendo però le caratteristiche dell'infiammazione acuta, e non evolvendo in cronica: stiamo parlando degli **ascessi**, infiammazioni acute che cronicizzano. Le ascessualizzazioni sono caratterizzate da fenomeni vasculo-essudativi con ricchezza di neutrofili.

Infine può avvenire che si sviluppi una risposta flogistica con le caratteristiche biologiche della risposta flogistica cronica fin dall'inizio (senza un precedente step di risposta flogistica acuta).

Se i meccanismi dell'infiammazione cronica funzionano ed eliminano infine la causa scatenante, si può avere guarigione, la quale si può manifestare con diversi aspetti:

-**restitutio ad integrum**, ossia ritorno al tessuto normale, che però in caso di infiammazione cronica è **molto raro**

-**riparazione e cicatrizzazione** del tessuto, ossia sostituzione del tessuto danneggiato e perso con tessuto connettivo neoformato, il che a sua volta può comportare come conseguenza functio laesa.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 29/10/2012

Lezione di Patologia generale e Fisiopatologia clinica del 29/10/2012
Sbobinatore: Franchini Annalisa
Revisore: Valentina Schiavone
Prof.: Berton

Abbiamo visto l'ultima lezione le molecole che sono in grado di mediare l'adesione e l'aggregazione piastrinica -due processi che sono strettamente collegati. Ora vediamo alcuni dettagli dell'aggregazione piastrinica.

AGGREGAZIONE PIASTRINICA

[slide 12 lez 4.2]
Questa figura è tratta dal Pontieri "Patologia generale" e illustra bene alcuni aspetti salienti dell'aggregazione piastrinica. Questo esperimento è fatto con un aggregometro *[già descritto in generale]*. Come vedete la trasmissione della luce aumenta progressivamente man mano che le piastrine si aggregano. C'è un basale, che qui è molto basso: cioè la trasmissione della luce è molto bassa in quanto le piastrine disperse interrompono il fascio luminoso. Se aggiungiamo un potente aggregante piastrinico, come l'ADP che aggiungeremo a più tappe, si verifica una modificazione di questa trasmissione della luce con una transitoria e rapida ulteriore diminuzione. Questa immagine illustra lo **shape change**, ossia la modificazione di forma, che rappresenta la prima risposta piastrinica. La più rapida di queste modificazione di forma comporta l'emissione di filopodi e amebopodi, ossia riarrangiamenti del citoscheletro stimolati dall'ADP attraverso meccanismi che vedremo successivamente. Questa modificazione di forma aumenta la superficie piastrinica e quindi aumenta la capacità di interferire con la trasmissione della luce. Come conseguenza avremo una diminuzione ulteriore della trasmissione nonostante progressivamente aumenta la trasmittanza, cioè il passaggio della luce aumenta man mano che le piastrine cominciano ad aggregarsi, Questa è un'immagine (*la terza immagine microscopica da destra*) presa dal punto della curva dove man mano e piastrine incominciano ad aggregarsi.

A seconda delle condizioni sperimentale in cui si conduce questa analisi possono succedere diverse cose; ciò che accade è sostanzialmente determinato dalla quantità di aggregante che si aggiunge:

- Se si aggiungono basse dosi di aggregante, quello che vedete è un aumento della trasmittanza con conseguente aumento della trasmissione della luce fino a raggiungere un plateau dopo il quale progressivamente la trasmittanza diminuisce per tornare ai livelli di partenza. Questo significa che l'aggregazioe piastrinica può essere un fenomeno reversibile e che, raggiunto un livello massimale, può reversibilizzarsi. Questi esperimenti sono stati condotti in condizioni tali da sottoporre le piastrine ad uno stress per cui, se le interazioni non sono stabili, questo fenomeno di reversibilizzazione risulta più facile da osservare. Concludendo, le piastrine possono ritornare al loro stato discoidale basale da cui erano partite.

- Un'altra possibilità consiste nell'usare maggiori quantità di ADP. Dopo il raggiungimento del plateau di aggregazione piastrinica si ha una fase di interruzione del fenomeno aggregatorio che però riparte fino a raggiungere una quota massimale. A questo punto l'aggregazione piastrinica diventa irreversibile; è possibile lasciare le piastrine lavate in plasma per un tempo indefinito senza che questi aggregati si reversibilizzano.

Questa curva di registrazione dell'aggregazione piastrinica evidenzia già una cosa importante: l'aggregazione piastrinica può avere due caratteristiche, ovvero può essere un'**aggregazione reversibile** (o primaria), di cui si conoscono bene le basi molecolari, o un'**aggregazione irreversibile** (o secondaria).

La quarta immagine al microscopio suggerisce la differenza fondamentale tra aggregazione primaria e secondaria: la piastrina al centro appare otticamente vuota essendosi svuotata quasi interamente delle sue popolazioni di granuli. Si può affermare con sicurezza che l'aggregazione irreversibile è strettamente dipendente dalla **degranulazione piastrinica**, cioè dal rilascio da parte delle piastrine di una serie di molecole adesive immagazzinate nei granuli alfa.

[slide 13 lez 4.2]
La prima fase di aggregazione piastrinica (aggregazione primaria) è dovuta ad un fenomeno di **inside-outside signaling**, cioè di attivazione dell'affinità dell'integrina α2bβ3 per il fibrinogeno. Quando una piastrina viene stimolata ad aggregare, viene stimolato innanzitutto un fenomeno di attivazione dell'affinità dell'integrina α2bβ3 per il suo ligando elettivo, rappresentato dal fibrinogeno, il quale farà da ponte tra piastrina e piastrina. Questi aggregati, che contengono diverse piastrine attaccate ad una molecola di fibrinogeno, non sono tuttavia stabili. Deve intervenire poi un evento di degranulazione affinché avvenga una stabilizzazione dell'aggregato che comporti l'irreversibilità e quindi la formazione del tappo piastrinico atto al blocco di un fenomeno emorragico dovuto ad una lesione vascolare.

Per capire l'importanza della degranulazione, vediamo qual è il contenuto delle due popolazioni di granuli piastrinici più importanti ovvero i granuli densi e i granuli alfa.

- I **granuli densi**, detti anche beta, sono chiamati così perché alle prime immagini al microscopio elettronico. apparvero in grado di trattenere in fascio di elettroni, quindi appaiono nerastri. Contengono un numero limitato di cose: **ADT** e **ATP**; questo definisce una situazione in cui la degranulazione scarica nell'ambiente un potente aggregante piastrinico, che è l'ADP, e quindi definisce un meccanismo di feedback positivo per cui stimolando le piastrine queste si "danno da fare" per indurre aggregazione di altre molecole. La **serotonina** è un vasocostrittore. L'ultima scoperta è che questi granuli contengono anche **polimeri di fosfato** (fino a 60-100 residui di acido fosforico) e questa osservazione detta il contesto dell'interazione tra sistema emostatico- piastrinico e sistema emostatico- coagulativo nel senso che questi polimeri di acido fosforico, con le loro cariche negative, sono in grado di attivare una particolare via di attivazione della coagulazione.
- I **granuli alfa** contengono moltissime altre cose e in particolare tutta questa serie di molecole: **VWF**, **fibrinogeno**, **fibronectina** e **trombospondina** (che vengono rilasciate all’esterno in quanto sono molecole solubili in ambiente acquoso) e **CD40L**, **JAM-A** e **C** (che sono inserite nella membrana dei granuli alfa e in seguito alla fusione del granulo con la membrana rimangono ancorate alla membrana plasmatica).

  Il significato di questo fenomeno sta nel rilasciare nello spazio inter-piastrinico tutta una serie di molecole che stabiliscono ponti tra la piastrina e questa stessa molecola; semplificando, in una prima fase l'interazione, essendo il fibrinogeno il ligando più concentrato presente nel plasma, è mediata soltanto dal riconoscimento del fibrinogeno da parte dell’integrina α2bβ3. In seguito a questo evento di degranulazione vengono rilasciate 4 molecole adesive, che si localizzano nello spazio interpiastrinico e che vengono riconosciute da recettori specifici: VWF da VWFR, VWF da α2bβ3, fibrinogeno da α2bβ3, fibronectina-α5β1 (espressa dalle piastrine), trombospondina da CD36 (presente sulla superficie piastrinica); in più ci sono queste interazione mediate da riconoscimento JAM-A e C e CD40-CD40L . Quindi il take on message è molto intuitivo: la degranulazione comporta il rilascio nello spazio interpiastrinico di molte molecole adesive nonchè l'espressione sulla superficie piastrinica di molecole adesive, come le JAMs, che mediano interazioni multiple tra piastrina e piastrina. A quel punto l'aggregazione non è più reversibile.

  Gli alfa granuli contengono anche una serie di fattori importanti nella regolazione della coagulazione sanguigna: contengono la p-selecrina (espressa sulla membrana plasmatica) oltre ad una serie di fattori di crescita (fattori di correlazione tra riparazione del danno vascolare e riparazione del tessuto alterato ade esempio da un trauma o da un processo infiammatorio; la piastrina partecipa a questo processo riparativo di un tessuto leso non soltanto riparando i vasi

anche secernendo fattori di crescita che favoriscono la proliferazione di cellule epiteliali) e nexine, inibitori del processo coagulativo.

Tornando alle funzioni fondamentali, il rilascio di alfa granuli è importante nell'aggregazione secondaria. L'ADP è importante perché è uno stimolante dell'aggregazione in quanto è riconosciuto da diversi recettori che stimolano particolari vie di trasduzione del segnale.

Il **fattore piastrinico IV**e la **beta-tromboglobulina** sono inibitori dell'azione di anticoagulanti come l'eparina e il suo corrispettivo endogeno, l'eparansolfato (punto di incrocio tra aggregazione piastrinica e coagulazione poiché le piastrine degranulate favoriscono la coagulazione inibendo l'azione degli anticoagulanti).

La **p-selectina** è un'importante molecola implicata nell'interazione con i leucociti: una volta formatosi l'aggregato piastrinico che espone p-selectina vengono ad aderire alle piastrine i leucociti, importanti sia nelle risposte acute, consistenti nel rilascio di fattori di crescita e a riparazione dei tessuti, sia nel fenomeno della cosiddetta degradazione, o riarrangiamento, del coagulo che si è formato da parte di cellule leucocitarie.

I **fattori di crescita** sono implicati anche nel contesto patologico: nella lesione ateroscelorotica si crea una condizione per cui il danno endoteliale che si sviluppa al di sopra della formazione dell' arteroma nell'intima vascolare, il rilascio di fattori di crescita da parte delle piastrine adese nell'endotelio alterato può avere un effetto di stimolo sulle funzioni delle cellule muscolari lisce legate alla tonaca media dell'intima vascolare.

Per quanto riguarda i polifosfati -componente dei granuli densi- si pensa che siano uno dei meccanismi attraverso cui si giunga all'attivazione del fattore XII a monte dell'attivazione della via intrinseca della coagulazione.

[slide 15 lez 4.2]
Questa immagine riassume alcuni aspetti centrali dell'aggregazione piastrinica. L'adesione -soprattutto sotto flusso- della piastrina al VWF o direttamente al collagene per mezzo dei recettori che abbiamo visto è di per sé in grado di generare due tipi di segnali attraverso molecole adesive implicate nell'adesione piastrinica. Il primo gruppo di segnali comporta il rilascio di **aggreganti endogeni**, quali il **tromboxano2** e l'**ADP**, cioè quelle due famiglie di aggreganti, uno preformato e accumulato nei granuli densi (ADP), l'altro neoformato a partire dal distacco dell'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana e la sua conversione in tromboxano da parte dell'enzima specifico ciclo-ossigenasi. L'altro gruppo di segnali che le interazioni adesive determinano sono segnali implicati nell'attivazione dell'α2bβ3, cioè nell'attivazione dell'affinità di questa per il fibrinogeno.

Questa freccia ha due punte [*silde 15 lez 4,2; freccia centrale rossa*] perché in realtà la situazione è ulteriormente complicata dal fatto che anche questa integrina (ossia α2bβ3) ha funzione segnalante: quindi è presente anche qui un circuito di feedback positivo, per cui anche le prime fasi di aggregazione piastrinica possono generare segnali che attivano il rilascio di aggreganti endogeni.

L'attivazione dell'affinità dell'integrina è implicata nell'aggregazione reversibile (primaria), mentre il rilascio degli aggreganti endogeni è assolutamente essenziale per la secrezione degli alfagranuli. Il blocco della produzione di tromboxano2, o il blocco dell'azione dell'ADP mediante farmaci che competono selettivamente per l'interazione dell'ADP al suo recettore, sono potenti antiaggreganti piastrinici. Questa potenza nell'indurre l'inibizione dell'aggregazione piastrinica è sicuramente dovuta alla loro capacità di inibire la secrezione degli alfagranuli e, allo stesso tempo, di amplificare l'attivazione dell' α2bβ3.

Queste due vie convergono nell'aggregazione secondaria irreversibile che rappresenta l'evento centrale alla base dell'emostasi piastrinica.

Questi eventi possono essere anche indotti da quegli **aggreganti** definiti **esogeni**, ossia non prodotti in questo questo circuito piastrinico, ma in altre vie. I più importanti:

- **trombina**, prodotto finale di attivazione del sistema di coagulazione sanguigna (altro importante punto di incrocio tra emostasi cellulare e plasmatica: la trombina generata viene riconosciuta da specifici recettori sulla piastrina e induce l'attivazione dell'integrina α2bβ3 ed il rilascio di aggreganti endogeni. Addirittura la trombina è in grado di indurre direttamente la secrezione di alfagranuli).
- **PAF** (platelets activation factor) e in particolare la **noradrenalina** sono in grado di stimolare le funzioni piastriniche e vedremo con che meccanismi e sistemi recettoriali.

[slide 16 lez 4.3]

Inibizione dell'aggregazione piastrinica

L'importanza dell'interazione tra integrina α2bβ3 e il fibrinogeno nell'aggregazione piastrinica ha stimolato una serie di ricerche sugli inibitori di queste interazioni integrina-dipendenti espanse anche al di la del contesto piastrinico. Alcune patologie infiammatorie, come la sclerosi multipla nel SNC, sono trattate con anticorpi che impedisco interazione linfociti con endotelio vascolare.

Per quanto riguarda l'aggregazione piastrinica questi approcci sono stati usati -in modo limitato- in quella che viene chiamata **PCI (percutaneous coronary intervention)**, tecnica molto usata per disostruire vasi coronarici ostruiti da lesioni arterosclerotiche. Nella sua forma più semplice questa tecnica si basa sull'utilizzo di un palloncino che viene gonfiato nel momento in cui un catetere ha raggiunto la coronaria disostruendo meccanicamente il vaso. Questa tecnica è stata affinata con l'uso di stent (reti parzialmente rigide che mantengono la coronaria beante). Uno dei rischi più importanti di questa procedura è rappresentato dalla ricclusione del vaso (con un'incidenza del 50% nel giro di alcuni giorni o massimo 1-2 settimane) data dal fatto che la procedura di rimozione meccanica della placca aterosclerotica danneggia l'endotelio vascolare esponendo il sottoendotelio e promuovendo adesione e aggregazione piastrinica. L'uso di inibitori dell'interazione integrina α2bβ3- fibrinogeno si è rivelato efficace nel ridurre il rischio di riocclusione in quanto questi farmaci bloccano l'aggregazione piastrinica per un tempo relativamente lungo (sulla base del tempo di utilizzo del farmaco), dando il tempo all'endotelio di ripararsi e ricostituirsi con un processo di angiogenesi. In questo modo non rappresenta più una superficie che induce aggregazione piastrinica, ma anzi una superficie antiaggregante. Il rischio di questi farmaci è dato dalla possibilità che ci siano fenomeni di sanguinamento.

Questi farmaci appartengono a famiglie diverse: una è un <u>anticorpo monoclonale</u> (un frammento di anticorpo monoclonale, **abciximab**, che si lega al sito di legame sulla catena α dell'integrina; questa catena è essenziale per l'interazione con il fibrinogeno). Gli altri farmaci sono dei <u>peptidi mimetici</u> che portano su un frammento peptidico queste sequenze amminoacidiche implicate nell'interazione tra l'integrina e il fibrinogeno. Sono terapie molto costose e possono essere usate solo per via parenterale in quanto per via orale sia il mab che i peptidi verrebbero degradati ed una parte dei peptidi verrebbe anche assorbita per via intestinale. Per questo motivo la problematica dell'inibizione dell'aggregazione piastrinica in pazienti che hanno subito una PCI si è un po' spostata verso farmaci più facili da usare, cioè assumibili per via orale, che sono molto efficienti nell'inibire l'aggregazione piastrinica.

<u>DIAGNOSTICA DELLE ALTERAZIONI PIASTRINICHE</u>

[slide 17 lez 4.3]

Ci sono due test fondamentali per la ricerca di alterazioni piastriniche, oggi un po’ in disuso:

- **conta piastrinica**: conteggio delle piastrine in circolo (valori normali 150.000-400.000/mm3).
- **tempo di sanguinamento**: determinare una lesione sulla faccia volare dell'avambraccio con un piccolo apparecchietto determinando un trauma al microcircolo superficiale della cute. A quel punto si fa partire il cronometro e si misura l'uscita di sangue, a goccie, raccolto con una carta assorbente, si misura il tempo di sanguinamento che ha un determinato valore in condizioni normali.

Vi sono altri indagini che vengono fatte oggi su scala più ampia e automatica:

- uso dell'aggregometro;
- il dosaggio del VWF per diagnosticare le patologie dovute a difetti di VWF;
- **PFA (platelets function assay),** che misura della capacità delle piastrine di aggregare se fatte passare su tubicini ricoperti di collagene e di un aggregante piastrinico, come ADP. Questo è un saggio fatto da una macchina che da un'entità di misura meno soggettiva o soggetta a variabilità del tempo di sanguinamento;
- western-blot o citofluorimetro per la misura dell'espressione di fattori di superficie.

[slide 18 lez 4.3]

Quando si faceva il tempo di sanguinamento era emersa una chiara relazione inversa e lineare tra conta piastrinica e tempo di sanguinamento (*in questa figura vedete che viene messo in relazione il numero di piastrine per mm3 e il tempo di sanguinamento*

in minuti).
Si deduce che:

- per quanto riguarda la conta piastrinica c'è un'elevata <u>riserva funzionale</u>: il tempo di sanguinamento, come indica la linea verticale, non cambia fino a circa 100.000 piastrine, ossia anche se il valore normale è compreso, al 99%, tra 150 e 400.000, 100.000 piastrine sono abbastanza;

- da quel momento in poi esiste una <u>correlazione inversa e lineare tra il numero di piastrine e il tempo di sanguinamento</u>, cioè più basso è il numero di piastrine, maggiore è il tempo di sanguinamento. Questa è la zona di tener d'occhio dal punto di vista clinico perché in questa zona una riduzione del numero dei piastrine comporta un'alterazione della capacità emostatica.

Ovviamente -come vedrete facendo clinica- si considera che fino a 20.000 piastrine/mm3 non ci siano grossi rischi di sanguinamento a meno che non ci siano combinati grossi difetti del sistema coagulativo. Quindi, di solito, le trasfusioni piastriniche si fanno al di sotto, di solito, di 20000/mm3 e non al di sopra, quindi la riserva funzionale, dal punto di vista della funzione emostatica, non da grossi rischi di sanguinamento, quindi con rischi per il paziente.

[slide 19 lez 4.3]

I difetti di funzione piastrinica sono quelli che vengono definiti **difetti di emostasi primaria**. Interessano di solito siti superficiali come la cute e le membrane mucose; possono essere caratterizzate da epistassi (sanguinamento dal naso), emorragie gastrointestinali o del tratto genito-urinario che possono essere anche abbastanza gravi, poi si osservano emorragie cutanee visibili ad occhio nudo.

Le **alterazione della funzione piastriniche** si dividono in trombocitopenie e trombocitopatie cioè in fenomeni di riduzione del numero oppure della funzione della piastrina.

<u>CAUSE PRINCIPALI DI TROMBOCITOPENIE</u>

Le trombocitopenie sono facilmente schematizzabili **[slide 20 lez 4.3]**. Questo schema vale anche per patologie delle cellule del sistema emopoietico:

- Ci può essere una diminuita produzione, in questo caso una diminuita produzione di megacariociti e quindi qualsiasi alterazione di funzione del midollo emopoietico può portare a piastrinopenia o trombocitopenia;
- Un secondo motivo molto particolare è dovuto al fatto che il 30-40% delle piastrine circolanti in realtà sono sequestrate nella milza e quindi qualsiasi aumento del volume splenico comporta una riduzione del numero delle piastrine circolanti. Questo è importante in tutta una serie di conseguenze di interventi chirurgici che comportino rimozione della milza. Per esempio le splenectomie comportano sempre un transitorio aumento – anche notevole- del numero delle piastrine circolanti che va tenuto sotto controllo in quanto un eccesso di piastrine può avere effetto patologico;

- Aumentata distruzione delle piastrine circolanti; ad esempio mediante meccanismi immunitari e quindi una delle manifestazioni possibili è dovuta alla produzione di anticorpi anti-piastrine che attraverso l'attivazione del complemento ricoprono una cellula portando alla rimozione della stessa da parte di cellule macrofagiche localizzate nel fegato;
- Aumentato consumo; ad esempio nella sindrome di Moskowitz un'eccessiva aggregazione piastrinica rende impossibile al midollo di ricostituire le piastrine perse quindi si arriva a una fase in cui si ha piastrinopenia;
- Aistruzione meccanica; ad esempio le piastrine, urtando contro valvole cardiache abbastanza rigide che sono state impiantate in soggetti con alterazioni valvolari, possono avere una ridotta emivita e quindi comportare una riduzione del numero delle piastrine circolanti.

<u>CAUSE PRINCIPALI DI TROMBOCITOPATIE</u>

Le trompocitopatie si posso classificare secondo questo schema **[slide 21 lez 4.3]**:

- Difetti di adesione come la sindrome di Bernard-Soulier e la malattia di VW (Von Willebrand);
- Difetti di aggregazione in cui rientrano la tromboastenia di Glanzman, cioè la mancata espressione dell'integrina α2bβ3, ma anche un gruppo di pazienti caratterizzati negli ultimi anni che presentano alterazioni dei recettori dell'ADP che comportano un legame dell'ADP con minore affinità che dà alterazione nella trasduzione del segnale e una ridotta aggregazioe piastrinica;
- Difetti di secrezione, per:
  - ridotta degranulazione dei granuli alfa. Abbiamo visto quanto sia importanete la degranulazione nell'aggregazione piastrinica;
  - difetti dell'attività della ciclo-ossigenasi su base genetica o dovuta all'assunzione di farmaci oppure
  - alterata biogenesi dei granuli che si verifica in alcune sindromi molto gravi (soprattutto pediatriche).
- Difetti dovuti a farmaci: la complessa dimensione della trasduzione del segnale all'interno delle piastrine, che è implicata nella loro funzione, determina il fatto che molti farmaci che alterano la trasduzione del segnale -usati proprio per questa loro capacità- possono alterare le funzioni piastriniche. Questo vale per tutto il gruppo di Ca-antagonisti che viene usato in patologie di tipo cardiaco che possono inibire la funzione piastrinica oltre a certi anestetici ed antibiotici.
- altre particolari situazioni, quali:
  - Sindrome di Wiscott-Aldrich, dovuta ad alterazione delle funzione di difese sia innate che attive (linfociti) a cui si associano però alterazione della funzione piastrinica.Questa sindrome è dovuta a una mutazione del gene che codifica per una proteina, definita di Wiscott- Aldrich, molto importante in tutti i fenomeni che rendono la riorganizzazione del citoscheletro importante anche per regolare la risposta piastrinica;
  - Sindrome di Scott in cui è stato scoperto un difetto del trasposto della fosfatidilserina sulla superficie piastrinica. Questo trasporto trasporto è importante in quanto la superficie piastrinica è la sede in cui si assemblano diversi fattori della coagulazione sanguigna.

COAGULAZIONE SANGUIGNA

L’altro grande sistema emostatico non è basato sulle piastrine, ma è prevalentemente composto da proteine solubili circolanti nel plasma.

[**slide 1 lez 5]**
Il sistema coagulativo è uno dei 4 sistemi polimolecolari solubili presenti nel plasma insieme al sistema del complemento, al sistema della plasmina (fibrinolitico) ed al sistema delle chinine.

Questa immagine definisce quali sono le tappe fondamentali dell'attivazione della coagulazione sanguigna:

- Avviene in grande misura nel contesto dell'aggregato piastrinico quindi le piastrine favoriscono l'attivazione del sistema della coagulazione esprimendo sulla loro superfici particolari tipi di fosfolipidi oltre al fattore tissutale rappresenta il fattore più importante nell'attivazione della coagulazione sanguigna.
- È caratterizzata da una serie di tappe che portano alla formazione di trombina, una proteasi centrale nell'evento coagulativo. La trombina ha come substrato diverse molecole tra cui il fibrinogeno e genera, tramite digestione proteolitica, la fibrina, una molecola insolubile, che si deposita tra le piastrine aggregate (è, infatti, difficile separare nettamente il processo di aggregazione piastrinica e quello di coagulazione sanguigna). La fibrina forma una rete, che poi viene stabilizzata anche da legami covalenti tra polimeri di fibrina. Questa rete stabilizza definitivamente l'aggregato piastrinico.

La formazione del coagulo può complicarsi per formare delle masse di una certa dimensione che intrappolano non soltanto cellule della linea mieloide ma anche globuli rossi. La formazione di questi coaguli sta alla base di un importante gruppo di patologie che hanno oggi un'elevata incidenza nei paesi industrializzati, rappresentato dai tromboembolismi cioè l'attivazione abnorme del processo di aggregazione piastrinica della coagulazione. Può formare delle masse all'interno dei vasi (trombi), che possono essere anche completamente occludenti e quasi completamente occludenti il vaso. Questi trombi possono determinare un'interruzione acuta dell'afflusso di sangue, ossigeno e nutrienti al tessuto determinando un infarto, una necrosi acuta del tessuto stesso.

I tromboembolismi sono patologie molto importanti e molto studiate.

[slide 3-4 lez 5]
I componenti della coagulazione sanguigna si possono schematizzare in diversi gruppi. Innanzitutto, componenti importantissimi, sono due gruppi di molecole: zimogeni e cofattori interagenti tra di loro. Il cofattore determina un aumento dell'attività degli zimogeni di parecchie decine di volte.

Gli **zimogeni** sono enzimi proteolitici che nel plasma circolano in forma inattiva e quindi relativamente innocua. In particolari condizioni vengono assorbiti dalla superficie piastrinica e, dopo aver interagito con i cofattori ed esser stati degradati proteoliticamente da una serie di proteasi, vengono attivati a proteasi attive che sono quindi in grado di agire con un meccanismo a rete su altri fattori della coagulazione.

Questo schema di funzionamento caratterizza molti sistemi polimolecolari solubili basati sull'attivazione reciproca tra molecole circolanti, normalmente in uno stato inattivo, ma se parzialmente attivate, attivano a loro volta altre molecole con un meccanismo a classico feedback positivo che rende non sempre facile controllare questo processo di attivazione. Per questa ragione i tromboembolismi sono così frequenti e non è così facile interrompere questo processo a cascata, anche se ci sono una serie di sistemi adatti a questo scopo.

Gli altri componenti essenziali di questo sistema sono una seria di **attivatori**, in particolare il **fattore tissutale** che esiste in diverse forme espresso su diverse cellule.

Infine vi sono una serie di **molecole inibitrici** che sono essenziali per regolare il processo coagulativo; esistono situazioni in cui l'assenza o il mancato funzionamento di questi inibitori shiftano l'equilibrio verso un eccesso di coagulazione sanguigna. Molti tipi di tromboembolismi sono oggi interpretati come fenomeni dovuti ad un difetto di funzione degli inibitori; in questa situazione l'equilibrio è spostato verso un eccesso di coagulazione, quindi, nel momento in cui si creano le condizioni perchè il processo coagulativo venga attivato, la mancanza di inibitori determina un eccesso di attivatori e una conseguente complicanza tromboembolica.

[slide 4 lez 5]
I componenti della coagulazione sono riassunti in questa tabella:

- fattori della coagulazione veri e propri;
- fattori aggiuntivi. Questi non sono essenziali ma ottimizzano il processo coagulativo. Per questo sono considerati importanti nell'attivazione della via intrinseca;
- una serie di inibitori

Alcuni di questi fattori, quelli evidenziati in rosso, sono zimogeni vitamina K -dipendenti, cioè sono molecole che devono essere modificate post- traduzionalmente, dopo la sintesi nel fegato, e questa modificazione enzimatica, operata dall'enzima agammacarbossilasi, richiede come cofattore la vitamina K.

Su questa caratteristica è basata la terapia anticoagulante usata in questo momento: esiste tutta una serie di farmaci antagonisti della vitamina K, chiamati genericamente coumarinici (il Coumadin è uno dei farmaci più usati). Questi farmaci interferiscono con l'azione della vitamina K, bloccando la modificazione post- traduzionale degli zimogeni e inibendo quindi il processo coagulativo. Questa terapia è essenziale per tutti i pazienti che hanno subito lesioni tromboemboliche.

[slide 5 lez 5]
Classicamente vi sono due vie di attivazione del sistema coagulativo: una via intrinseca e una via estrinseca, che convergono nella via comune.

La via comune è formata da uno zimogeno, il **fattore X**, che insieme a un cofattore attiva l'enzima chiave del sistema coagulativo rappresentato dalla trombina.

Come si vede vi sono diverse vie, oltre ad alcune qui non riassunte, che possono attivare la via intrinseca, (ad esempio acidi nucleici cellulari, la relazione tra danno tissutale, riparazione e processo coagulativo, le piastrine attivate che rilasciano polifosfati, la superficie di certi microrganismi, le superfici cariche negativamente come il tessuto connettivo sottoendoteliale).

La via estrinseca è attivata invece da una molecola definita **TF**(**tissue factor** o fattore tissutale) che si trova espresso sulla superficie di cellule mieloidi, in una particolare struttura, molto discussa ma alla fine accettata, circolante nel plasma (le microvescicole), su cellule endoteliali attivate ed infine su cellule di moltissimi tessuti in modo diverso (alcuni ne sono ricchissimi come il cervello e la placenta).

Ogni volta che si rompe un vaso e il plasma viene a contatto con il tessuto circostante, il fattore VII è in grado di interagire con il fattore tissutale convergendo nella via comune ed attivando il fattore X.

Le vie si chiamano così perché quando si è iniziato a caratterizzarle emerse chiaramente che la via intrinseca era dovuta a una serie di fattori intrinsecamente presenti nel plasma (se fate un prelievo e mettete il sangue in una provetta di qualsiasi materiale, il sangue coagula).

Basta quindi quello che c'è nel sangue (plasma) per formare un coagulo oltre ad una superficie qualsiasi (di solito molto ricca di cariche negative che permette l'interazione di questo fattore XII, fattore di Hageman, con la superficie e la sua attivazione).

L'altra via si chiama estrinseca perché, durante i primi studi, il fattore tissutale, cioè il principale fattore di attivazione della via estrinseca, venne caratterizzato come un fattore presente fuori dal vaso, cioè come una proteina di membrana presente sulla superficie delle cellule epiteliali di vario tipo ma anche mesenchimali, eccetera. In quel caso il modello era rappresentato dal fatto che un danno vascolare fa venire a contatto il plasma con questo fattore estrinseco al vaso stesso presente sulle cellule del tessuto e questo fattore attiva la coagulazione.

Qui vedete una freccia – *in rosso*- che dice una cosa molto importante: in realtà queste due vie non sono assolutamente separate ma il fattore VII attivato dal fattore tissutale è in grado di attivare un'importante componente della via intrinseca rappresentata dal fattore IX.

In condizioni normali la vera via di attivazione della coagulazione sanguigna in vivo è prevalentemente questa:dal fattore VII si passa all'attivazione del fattore IX e del suo cofattore e questa via poi va sul fattore X.

Lo studio dei polimorfismi nella popolazione umana ha fatto emergere una cosa che ha un po "stravolto" gli schemi tradizionali sulla coagulazione sanguigna: vennero identificati soggetti con un difetto del fattore XII che non presentavano assolutamente patologie emorragiche e, al contempo, i difetti del fattore IX e del cofattore del fattore IX, cioè il fattore VIII, sono responsabili delle due più importanti coagulopatie umane che sono l'emofilia A e l'emofilia B.

Quindi all'interno di questo schemino diventava impossibile spiegare come mai il primo difetto non causa nessun difetto di coagulazione (quindi nessuna complicanza emorragica), mentre il secondo difetto causa grave complicanza emorragica.

Esiste questa via molto importante in vivo che di per sé regola probabilmente la gran parte dei processi coagulativi.

Questa via è stata recentemente riapprezzata sia nel contesto della scoperta che le piastrina possono attivarla e regolarla rilasciando polifosfati, sia nel contesto di tipo patologico; nel senso che questa via viene normalmente attivata nelle sepsi, cioè quando la presenza nel circolo sanguigno di microrganismi o loro derivati attiva diverse risposte biologiche tra cui il processo coagulativo.

Queste recenti scoperte stanno stimolando anche ricerche farmacologiche perché per quello che si è visto un'inibizione del fattore XII non dovrebbe comportare gravi emorragie ma potrebbe bloccare un'abnorme attivazione della coagulazione nel corso delle sepsi.

[slide 6 lez 5]
Questo è uno schema sintetico. In mezzo vi sono tante altre molecole; è facile però schematizzare 3 nodi centrali nell'attivazione

del sistema coagulativo e questi tre nodi sono schematizzabili con l'interazione tra uno zimogeno, una proteasi circolante in forma inattiva ma attivabile ed un cofattore, che non ha attività enzimatica di per se, ma che regola l'attività enzimatica dello zimogeno.

Queste tre interazioni caratterizzano la via estrinseca e rappresentano una sorta di forzatura nel senso che il fattore VII è sicuramente uno zimogeno, mentre il fattore tissutale è un cofattore nella misura in cui è proprio un iniziatore della via estrinseca e anche di tutto il sistema coagulativo.

La seconda importante interazione è quella il fattore VIII e IX: il fattore IX ha bisogno di interagire con il fattore VIII per svolgere le sue funzioni. L'emofilia di tipo A comporta mutazioni del gene per il fattore VIII mentre l'emofilia B comporta mutazioni del gene per il fattore IX.

Infine l'ultima interazione rappresenta quella con il fattore zimogeno centrale, il fattore X, ed un cofattore.

Tutti questi zimogeni, più altri che incontreremo, sono vitamina K- dipendenti quindi la loro funzione è alterata utilizzando procedure o approcci farmacologici che “siano antagonisti” della funzione della vitamina K. Il fattore V e VIII sono regolati intrinsecamente da importanti sistemi di regolazione della coagulazione sanguigna che li inattivano e quindi mantengono frenato il processo coagulativo.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 30/10/2012

Caterina Gardener

Prof. Dusi

30/10/12

AMILOIDOSI

Diverse forme patologiche che hanno tutte quante una stessa caratteristica e sono processi quindi patologici tutti caratterizzati da depositi di materiale di natura proteica insolubile, e questo materiale si può deporre in diversi organi provocando dei problemi. Questi depositi sono tipicamente extra cellulari e solitamente danneggiando i tessuti con vari meccanismi. Essenzialmente i meccanismi principali sono legati al fatto che questi depositi di materiale amorfo e insolubile **alterano gli scambi trofici** siccome si depositano, poi vedremo, spesso intorno ai vasi formano dei cuscinetti che impediscono il passaggio di ossigeno e del materiale nutritivo, ma l’amiloide non è solo una barriera meccanica ma èanche una sostanza che può **attivare direttamente delle cellule**, quindi attiva funzioni come per esempio la produzione di radicali liberi dell’ossigeno, l’apoptosi, causando quindi danno cellulare.

CARATTERISTICHE GENERALI DELL’AMILOIDE

Tutte le amiloidi hanno le stesse caratteristiche, hanno tutte quante un aspetto amorfo e ialino, ossia vitreo, trasparente esiste una colorazione specifica che è l’unica che dà la certezza che si tratti di amiloide, che è il rosso congo, e tale colorazione viene fatta su biopsie prelevate dai tessuti con sospetto di amiloidosi e per ovviamente confermarli se è materiale amiloide. Poi possono essere fatte altre colorazioni, per esempio con lo iodio si colora in giallo-rosso, però la colorazione specifica è quella con rosso congo.

STRUTTURA DELL’AMILOIDE

È una struttura che è formata prevalentemente da fibrille, 90% da fibrille, oltre a questa proteina fibrillare ci sono altre due componenti, una è la componente AP poi ci sono carboidrati complessi.

PROTEINA FIBRILLARE

Le fibrille sono composte da una doppia elica, due eliche arrotolate una sull'altra, e queste due eliche, sono formate a loro volta da strutture che hanno tipicamente la struttura a foglietto beta. In pratica se non c'è il foglietto beta non c'è amiloide, l'amiloidosi ha soltanto questa struttura. Quindi dovreste immaginarvi queste due eliche formate da foglietti beta e queste eliche si aggregano, formano dei pacchetti, che sono appunto quei pacchetti, quei fasci insolubili di amiloide, che sono resistenti alla digestione da parte di proteasi e sono quindi, una volta depositatesi, praticamente irremovibili, non si riescono più a spostare dall'interstizio dei diversi organi.

COMPONENTE AP

La componente AP che sta per amiloide plasmatico, è una proteina che è un'alfa proteina sierica, si chiama SAP, che sta per *serum amyloid protein*, cioè proteina sierica dell'amiloide, che è una normale proteina circolante nel plasma. È un'alfa globulina che assomiglia alla proteina c reattiva (la proteina c reattiva è una proteina che aumenta di molte volte quando c'è un'infiammazione, tutti i laboratori di ospedali misurano nel sangue dei pazienti la proteina c reattiva, per vedere come sta andando l' infiammazione, più è alto il suo livello e più è stimolato il fegato. Comunque questa proteina ha la caratteristica di essere una <u>pentrassina</u>, vuol dire una struttura pentamerica , formata da 5 monomeri, che formano un anello pentagonale. Questa componete AP la troviamo legata alle fibrille.

CARBOIDRATI COMPLESSI

Poi ci sono carboidrati complessi che sono dei glicosamminoglicani eparansolfato, cioè carboidrati complessi che troviamo nel normale interstizio degli organi.

Questa è la struttura generale di questi aggregati di amiloide.

FORME CLINICHE DI AMILOIDOSI

Come questo amiloide si deposita nei tessuti crea problemi e di conseguenza i clinici hanno classificato l'amilodosi in essenzialmente 4 forme critiche:

-<u>primaria</u>, detta appunto di una malattia primaria (primario in medicina vuol dire che non ha una causa apparente, primitiva, non ha qualcosa che l' ha causata. In realtà questo qualcosa per forza c'è, è che si dice primaria perche non sappiamo cosa l'ha causata). Quindi l'amiloidosi primaria si dice che è quella che non ha patologie associate a progressi apparenti, in realtà adesso li abbiamo identificati, ad esempio spesso si tratta di un tumore che si chiama mieloma multiplo, poi ne parliamo.

-<u>Secondaria</u>, che invece è legata a altre affezioni pregresse, è una complicanza, nel senso che il soggetto ha un'amilodosi come complicazione di una malattia che è di solito un'infiammazione cronica, che vuol dire che dura a lungo nel tempo (cronico deriva da chronos che vuol dire tempo), quindi in pratica cronico vuol dire malattia che dura a lungo nel tempo, quindi non una qualsiasi infiammazione, questo per capire: anche l'influenza dà un'infiammazione del laringe, del faringe, ma non dà amiloidosi perche è un'infiammazione che ha una durata molto breve nel tempo. Solo infiammazioni di lunga durata scatenano amilodosi; qui cito la tubercolosi che è paradigmatica per molte altre malattie infiammatorie croniche; poi anche tumori, non tutti, ma alcuni perché possono attivare gli stessi meccanismi che attivano le flogosi, causando amiloidosi secondaria.Come vedete le forme di amiloidosi si differenziano anche per la localizzazione dell'amiloide, nel senso che l'amilodosi primaria coinvolge prevalentemente zone come lingua, cuore, cute, nervi che invece non sono, o sono poco interessate dall'amiloidosi secondaria che invece predilige milza, fegato, reni. Quindi dalla distribuzione dell'amiloidosi possiamo già un po' predire di che tipo di amiloidosi si tratti. Questo non vuole dire che nell'amiloidosi primaria non sia coinvolto anche il fegato o la milza, che vengono sì coinvolti, ma non è il coinvolgimento prevalente.

-<u>amiloidosi familiare</u> che sono forme ereditarie

-<u>amiloidosi isolate</u> o organo-limitate, amilodosi in cui viene colpito un solo organo, un solo parenchima, quindi solo articolazioni, solo la cute, solo le ghiandole endocrine, oppure solo il cervello e allora abbiamo la malattia di Alzheimer, la forma di amilodosi più celebre

CLASSIFICAZIONE BIOCHIMICA

Il biochimico ha classificato l' amiloidosi a seconda del tipo di sostanza amiloide, e in particolare a seconda della proteina da cui deriva l'amiloide, perché abbiamo detto che la sostanza amiloide deriva dalla trasformazione, dall'alterazione di proteine normali.

Allora vengono classificate così:

-**AL** (che sta per *amyloid light chain*, cioè amiloide delle catene leggere) corrisponde all'amiloide che troviamo depositata nelle forme che prima abbiamo chiamato primarie, in cui si depositano le catene leggere delle immunoglobuline

-**AA**(che sta per *amyloid acute phase*) con fase acuta si intende la risposta dell'organismo all'infiammazione e qui si deposita un pezzettino, un amminoterminale di una proteina che si chiama SAA (*serum amyloid associated protein*), il tipico deposito dell'amilodosi secondaria, che abbiamo visto essere secondaria a infiammazioni croniche o tumori

-**AF** (che sta per amiloidosi familiare) in cui si deposita una proteina che si chiama transtiretina, proteina, come dica la parola trans, di trasporto di t3 e t4, degli ormoni tiroidei. Forma familiare nel senso che c'è una mutazione, la transtiretina è mutata e assume il foglietto beta

-**AE** (che sta per *amyloid endocrine*), amiloidosi deriva da deposito di precursori ormonali

-**AS** (che sta per *senil* (ndr)) in cui si deposita la transtiretina, che in questo caso non è mutata ma è solamente avvolta in maniera sbagliata. Nelle forme senili vengono incluse in molti testi l'**amiloide beta**, quella diversa che si deposita nell' Alzheimer, che non è un precursore ormonale ma un'altra cosa: placche nel cerevello.

-**AH** (dell'emodialisi) che nei nuovi testi è trovata indicata non come AH ma con la sigla Aβ2M, perché lì si deposita una proteina che si chiama beta 2 microglobulina. Sui testi più recenti troverete anche un'altra sigla: le amilodosi familiari seguite da transtiretina vengono chiamate anche come ATPR che sta per amyloid transthyretin protein amyloidosis.

Da questo scheminoavete capito che la sostanza amiloide non deriva da un solo precursore, ma può derivare da un sacco di proteine, vuoi da microglobuline o da pezzi mi microglobuline, da pezzi di proteine prodotte durante la fase acuta, dalla transtiretina, da altre proteine ancora, quindi vari tipi di proteine che si depositano nei tessuti, sempre a patto che vi ricordo vi siano le condizioni da formare il foglietto beta, se non hanno la configurazione beta, non si depositano.

PATOGENESI DELL'AMILOIDOSI

Quindi la patogenesi dell'amiloidosi, se la vogliamo riassumere brevemente, come tutti questi tipi di precursori diversi diventano amiloide? Diventano amiloide essenzialmente in due modi

-o per clivaggio, cioè taglio da parte di una proteasi, proteasi che tagliano un pezzettino che diventa foglietto beta e si deposita nei tessuti

-oppure perche le proteine, questo per le forme familiari, sono mutate, la mutazione altera la struttura terziaria della proteina, la proteina assume la configurazione di foglietto beta e si deposita nei tessuti.

Questi sono i due modi in cui l'amiloide può andare a formarsi. Quindi in pratica tutte le malattie che causano amiloidosi, causano o il taglio proteolitico dei precursori, o una mutazione dei precursori.

PATOGENESI DELL'AMILOIDOSI REATTIVA SISTEMICA(TIPO AA, FORMA SECONDARIA)

In questo caso le fibrille derivano dal precursore che è la proteina di fase acuta SAA, che è una proteina prodotta in grande quantità dal fegato quando (tra l'altro ha anche funzione apoproteina per l'HDL), c'è un'infiammazione di lunga durata, oppure tumori. Perché sia nell'infiammazione, sia nei tumori vengono prodotti mediatori chimici, le citochine, le quali vanno a stimolare il fegato a produrre questa proteina. Di conseguenza sia durante la flogosi, perché i leucociti producono citochine che stimolano il fegato, sia che in certi tumori, perchè in alcuni linfomi, tumori renali ci può essere produzione di citochine. Voi sapete che i tumori sono cellule strane, possono svolgere funzioni molto diverse da quelle delle cellule da cui hanno origine, per cui non stupitevi se ad un certo punto un tumore si mette a produrre citochine, mediatori che causano guai nell'organismo, guai che vengono chiamati sindromi paraneoplastiche, cioè malattie, come l'amiloidosi, che sono legate alla presenza del tumore, non al tumore stesso, ma a fattori prodotti da parte del tumore. Questi mediatori stimolano il fegato, il fegato produce SA in quantità molto maggiore al normale, l'SA circola e viene catturata nei tessuti dai macrofagi tissutali, i macrofagi la digeriscono, la fanno a pezzi e poi rilasciano alcuni di questi pezzi tagliati, e tra questi quello che ci interessa è il peptide corrispondente alla parte amminoterminale della proteina, che a questo punto, una volta tagliato, assume la conformazione di tipo foglietto beta, e si combina con la sostanza AP plasmatica e con i glicosamminoglicani interstiziali e si deposita in forma di amiloide. Come vedete in questo caso i macrofagi hanno molta importanza nella formazione di questa proteina e nella sua deposizione.

CONDIZIONI CHE PORTANO ALL'AMILOIDOSI REATTIVA SISTEMICA(TIPA AA)

Le condizioni, sono quindi condizioni in cui c'è abbondanza di citochine, quindi essenzialmente durante infiammazione di lunga durata, quindi ho citato alcuni casi ma sapete che ce ne sono molti di più

Esempi:

-malattie reumatiche, voi sapete che c'è una malattia molto grave che si chiama artrite reumatoide che dà la deformazione delle articolazioni, un'infiammazione la cui causa è ignota, ma si sa che c'è l'immunità che reagisce in qualche maniera, che va a infiammare le articolazioni; malattia di lunga durata che comporta liberazione di molte citochine.

-infiammazioni intestinali di lunga durata, non un'enterite che dura un mese, parliamo di enteriti per esempio come la colite ulcerosa, la retrocolite ulcerosa è una malattia molto grave caratterizzata da infiammazioni del colon e del retto, con ulcere multiple sanguinanti all'interno del colon retto, quindi sintomatologia gravissima con dolori addominali e diarrea più sanguinamento, anche questa causata da qualcosa che fa scatenare la nostra immunità contro l'intestino. Non si sa cosa sia questo qualcosa, c'è chi dice che sia un'infezione, ma sta di fatto che i linfociti vanno nell' intestino e lo attaccano come se fosse un batterio o un virus; questa malattia dura a lungo e oltre a tutto il danno causato dall'enterite, comincia a depositarsi l'amiloide nel fegato, nel rene e comincia a avere collaterali della malattia di tipo renale, epatico e che sono causati dalle citochine liberate durante la flogosi.

-osteomieliti croniche (osteomieliti sono infiammazioni delle ossa),

-infezioni croniche come la tubercolosi, che sapete ha un lungo decorso,

-tumori che producono citochine e quindi hanno un effetto come la flogosi

-linfoma di Hodgkin, che è un tipo di linfoma dei linfociti, dei linfonodi

-il carcinoma renale

-febbre mediterranea familiare, malattia autosomica recessiva, ma non sappiamo quale sia e a cosa serva la proteina malata, malattia caratterizzata da attacchi febbrili nei bambini, infiammazioni delle sierose,quindi peritonite, pleurite, situazione quindi gravissima a lungo andare accompagnata da deposizione di amiloide.

Quadro clinico:

Quindi aspettatevi che questi pazienti abbiano un problema che può essere la tubercolosi, un tumore, in un certo momento cominciano ad avere, oltre ai sintomi causati da tubercolosi, tumore, etc, anche sintomi da depositi di materiale amiloidogenico e materiale amiloide nei tessuti e quindi siccome vi ho detto che si deposita prevalentemente nei reni, nel fegato e nella milza, avremo danni renali con proteinuria (che vuol dire perdita di proteine,che normalmente non dovrebbero essere filtrate, con le urine), aumento di volume del fegato, quindi epatomegalia, aumento della milza, aumento di volume dei reni; tutto questo per deposito di materiale amiloide.

PATOGENESI DELL'AMILOIDOSI DA DISCRASIE IMMUNOCITICHE(TIPO AL, PRIMARIA)

Vediamo la patogenesi dell'amiloidosi detta primaria, quella che apparentemente non ha una causa, ma ce l'ha; quella in cui si deposita la proteina AL (light chain), il cui precursore è la catena leggera delle immunoglobuline e in pratica le malattie che la causano devono essere malattie in cui si producono abnormi quantità di catene anticorpali. La patogenesi è la stessa: queste immunoglobuline escono dal sangue e vanno nei tessuti, vengono endocitate dai macrofagi, i macrofagi le tagliano a pezzi, rilasciano un pezzettino delle catene kappa o lambda e questo pezzettino, se questa regione ipervariabile ha una sequenza amminoacidica che gli consente di formare un foglietto beta, si depositerà nei tessuti, altrimenti no; perchè sapete che le regioni delle immunoglobuline sono ipervariabili quindi dipenderà dalla sequenza amminoacidica dell'immunoglobulina in questione la capacità di formare o meno il foglietto beta.

CONDIZIONI CAUSANTI AMILOIDOSI AL

Quindi le condizioni che causano questo tipo di amiloidosi saranno tutte condizioni in cui ci sia un'abnorme produzione di anticorpi e quindi discrasie (termine tecnico per anomalie)della linea dei linfociti b. Quindi di queste amiloidosi, che una volta erano dette primitive perchè non si conosceva la causa, adesso le cause si conoscono.

-Il mieloma multiplo, tumore maligno delle plasmacellule con esito infausto, incurabile,caratterizzato da proliferazione delle plasmacellule nel midollo osseo che causano erosione delle ossa, tipiche del mieloma (multiplo perchè multiple erosioni), vengono attivati gli osteoclasti, in pratica queste plasmacellule tumorali, producono una grande quantità di immunoglobuline, tra l'altro siccome i tumori sono di origine monoclonale, ogni mieloma produce un solo tipo di immunoglobuline, kappa o lambda (infatti studiando il mieloma si è scoperto che i tumori derivano da una sola cellula malata; se non fosse così verrebbero prodotti più tipi di immunoglobuline perché più cellule avrebbero dato origine al tumore), queste immunoglobuline poi le troviamo nelle urine, che è tipica della diagnosi di questo tumore: si vedono le erosioni multiple più la proteinuria, che si chiama proteinuria di bence jones, cioè la presenza di catene kappa o lambda nelle urine del paziente, che diventano quindi torbide e con aspetto schiumoso. Praticamente l'amiloidosi c'è solo in una piccola percentuale di casi perché dipenderà dal tipo di immunoglobulina prodotto dal mieloma. Se un certo mieloma produce Ig che una volta tagliate non daranno foglietto beta, non si avrà la malattia, se invece la sequenza permette la formazione di foglietto beta si avrà la malattia.

-Un'altra malattia analoga è la macroglobulinemia di Waldenstrom, sempre linfoma, tumore dei linfociti, si chiama così perché questo tumore non dà erosioni delle ossa ma molti di questi linfociti malati differenziamo a plasmacellule e producono tutti igM, quelle grosse, sono pentameri, ecco perché si chiama macroglobulinemia, perchè sono macroglobuline, le più pesanti; pensate che questo tumore produce così tante Ig che il sangue diventa talmente vischioso che circola a fatica; c'è una sindrome di iperviscosità del sangue, il paziente ha problemi di vista, alterazioni neurologiche perchè non circola più bene il sangue oltre a questi problemi c'è la deposizione di Ig nei tessuti, con amiloidosi in quei siti specifici.

-linfomi delle linee b

Quadro clinico:

Il quadro clinico è caratterizzato, anche qui ci può essere deposizione nel fegato ed epatomegalia ma, a differenza della forma precedente (amiloide AA), nell'amiloide AL abbiamo deposizioni particolari tipo nei nervi, quindi neuropatie periferiche; nella lingua, veramente tipico, la lingua si ingrossa, c'è macroglossia (ingrossamento della lingua) con difficoltà nella parola, nella deglutizione; miocardiopatia restrittiva, cioè ingrossamento del cuore, restrittiva perché ispessendosi la parete per la deposizione dell'amiloide, si restringe la cavità cardiaca, c'è quindi una restrizione del sangue che circola nel cuore; artropatie ; malassorbimento per la deposizione nell'intestini e noduli cutanei anche abbastanza tipici che non ci sono nell' altra malattia, perché c'è deposizione nella cute.

La domanda che dovreste farmi è: ma come mai un tipo di amiloide si deposita da una parte e un altro tipo si deposita in un'atra? Risposta: mistero! Nessuno lo ha ancora capito, probabilmente diversi tipi di amiloide hanno affinità per diversi tipi di interstizi, per proteine che si trovano in diversi tipi di interstizi. Ma non si sa. Alcuni dicono che ci sia un *fattore x* (x=sconosciuto) che forse determina la deposizione in un luogo o nell'altro.

AMILOIDOSI FAMILIARE(TIPO AF-ATTR)

L'amiloidosi di tipo familiare è quella della transtiretina, presenta due quadri essenziali:

-forme ereditarie che sono essenzialmente polineuropatia, colpisce i nervi

-forma senile generalizzata che colpisce vari organi, prevalentemente cuore e polmoni

In queste forme si deposita questa prealbumina che serve per il trasporto di ormoni tiroidei e vitamina A, non c'è proteolisi da parte dei fagociti, quella che si deposita è l'intera catena, perchè la catena è mutata, quindi è una malattia ereditaria.

AMILOIDOSI DA EMODIALISI (TIPO Aβ2M)

Poi c'è un'amiloidosi che si chiama Aβ2M, che è da emodialisi; ormai *era* da emodialisi, io ve la cito solo perche è storica, adesso non esiste più questa forma. Questa forma esisteva quando si usavano le vecchie membrane da dialisi e queste non lasciavano passare questa proteina beta 2 microglobulina, un'antiproteasi, un inibitore delle proteasi presente normalmente nel sangue; non venendo filtrata, dopo anni di dialisi questa proteina continuava ad essere ritenuta nell'organismo del dializzato e di conseguenza si depositava sotto forma di amiloide. Le moderne membrane da dialisi tengono presente anche questo e filtrano la beta 2 microglobulina e di conseguenza questa forma di amiloidosi è scomparsa. Questa ve la cito perché è una malattia iatrogena, che vuol dire causata dal medico, ovviamente involontariamente, ma perche le strutture e i metodi non erano ancora stati perfezionati.

FORME LOCALI DI AMILOIDOSI

SENILE

La Forma senile localizzata di amiloidosi, anche qui si deposita essenzialmente solamente nel cuore, si deposita la transtiretina che in questo caso non è né mutata né tagliata, è praticamente la transtiretina normale. Allora perché si deposita? È probabile che con l'invecchiamento la transtiretina, anche la molecola normale, abbia un'alterazione del folding, cioè dell'avvolgimento su se stessa che ne comporta la precipitazione nel tessuto cardiaco. Si deposita intera e non mutata in questo caso.

CUTANEA NODULARE

C'è una forma cutanea nodulare in cui si formano dei noduli soltanto nella pelle, forma locale, si suppone derivino da precursori di cheratine, ma anche qui c'è un punto di domanda perché non si sa da dove derivino esattamente queste amiloidosi.

ENDOCRINA

C'è una forma endocrina causata da tumori endocrini, per esempio tipica è la cosiddetta amiloidosi AmiloidCal(ACal), che sta per calcitonina, e nel cancro della tiroide si può appunto depositare in alcuni casi la calcitonina.

ATRIALE

C'è una forma atriale in cui si deposita il derivato del fattore natriuretico e nei libri la trovate indicata con la forma AANF che sta per *amyloid atrial natriuretic factor.*

CEREBRALE

C'è poi la forma localizzata cerebrale su cui vale la pena fermarsi un attimo perché parliamo della malattia di Alzheimer.

Quindi abbiamo visto che questa amiloidosi può localizzarsi generalmente o localmente e può derivare da precursori ed è di solito la complicazione di altre malattie, quindi va prevenuta, curando infiammazioni e tumori, quello che non si può fare è tirar via l'amiloide che si è già depositata, perché quella è insolubile e inattaccabile da proteasi, e non la smuove più nessuno.

MALATTIA DI ALZHEIMER

Parliamo della malattia di Alzheimer. Malattia molto grave, grave per il paziente, grave per chi deve curare il paziente, grave per chi deve curare il paziente perche si tratta di una graduale e progressiva perdita dei neuroni, con progressiva disgregazione della personalità e quindi una condizione in cui la gestione del paziente non è sempre facile. Il paziente perde prima la memoria, e poi col passare del tempo perde proprio la cognizione di tutto quello che è la sua vita normale, cioè esce da se stesso, non riconosce i figli, non riconosce i genitori. In pratica ci sono due forme sostanziali di malattia di Alzheimer: un terzo dei casi è dovuta a fenomeni genetici, cioè è dovuta a mutazioni e i due terzi è dovuta a condizioni non genetiche, non familiari, può insorgere in qualsiasi individuo, a prescindere dalla familiarità. Vediamo quindi come avviene, vi faccio qui un discorso abbreviato, perche sarebbe lunghissimo, immaginate quanto sia pubblicata e quanto sia studiata questa malattia, che ancora non ha una cura e non è neanche sempre di facile diagnosi, perchè spesso all'inizio può confondersi con altre alterazioni della memoria.

Ci sono **due tipi di lesione** nel cervello:

-la placca diffusa, che sono fibrille di sostanza amiloide attorniate da microglia, astroglia, e intorno c'è un alone di neuroni degenerati, morenti.

-l'amiloide vasale, cioè l'infiltrazione da parte dell'amiloide della parete dei vasi e questo comporta che vengono alterati gli scambi trofici a livello cerebrale, cioè dal sangue non arriva più nutrimento ai neuroni, ed anche questa è un'altra fonte di danno.

Queste sono le due lesioni che si osservano nel cervello di un paziente malato di Alzheimer.

Da dove deriva questa proteina che si deposita nei vasi e forma queste placche?

L'amiloide deriva da un precursore che si chiama APP, che sta per *amyloid precursor protein*, cioè proteina precorritrice dell'amiloide, ed è una glicoproteina transmembrana, ossia che attraversa tutta la membrana dei neuroni; di solito una proteina transmembrana si pensa sia un recettore, ma non sappiamo in realtà cosa sia e a cosa serva. Tra parentesi questa proteina è espressa anche in molti altri tipi di tessuti, solo che sono isoforme diverse, c'è uno splicing alternativo della proteina cerebrale e di

quella di altri tessuti e questo forse spiega perchè il danno avvenga solo a livello cerebrale e non di altri tessuti, però anche qui ci sono molti misteri. Comunque sia quella del cervello **è tagliata da proteasi in due maniere**:

1. il taglio è in un punto che forma poi peptidi che restano solubili e quindi non sono dannosi, questo avviene per azione di secretasi, che sono delle proteasi di tipo alfa, le cosiddette alfa e gamma secretasi (l'alfa secretasi è una, mentre la gamma secretasi non è una sola, ma è tutta una batteria di secretasi, che comprende per esempio la (ndr?). Batteria di secretasi che agiscono in sequenza).

2. La situazione 2 avviene con un taglio diverso, non più ad opera di alfa e gamma secretasi ma ad opera di beta secretasi più la batteria delle gamma secretasi, in questo caso si formano peptidi diversi, di 39-42 aa, che a contatto col glicosamminoglicano e l'interstizio precipitano e formano l'amiloidosi.

Quindi la malattia si ha solo col secondo tipo di taglio. La domanda successiva è: **quali sono le condizioni in cui si verifica questo tipo di taglio?** Perché si verifica la condizione b e quindi la malattia? Ci sono ragioni genetiche e metaboliche.

Ragioni genetiche

Le ragioni genetiche riguardano le forme che abbiamo detto essere quelle familiari, e sono o una mutazione del precursore APP o una mutazione delle secretasi, ciò vuol dire che una mutazione ereditaria, per cui cambia la sequenza amminoacidica del precursore e questo permette l'aggancio, non più delle secretasi diciamo alfa e gamma, ma delle beta e gamma. Oppure viceversa sono mutate le secretasi e la proteina è normale, ma la secretasi mutata può tagliare in un punto diverso, amiloidogenico, e quindi creare l'amiloide che si deposita in forme di fibrille. L'altra possibilità genetica è che ci sia un'iperproduzione di precursore, e questo si è visto nella sindrome di Down, in cui c'è trisomia del cromosoma 21 e 22 e proprio sul cromosoma 21 si trova il gene del precursore dell'amiloide, di conseguenza il paziente affetto da questa sindrome verso i 40anni comincia a sviluppare una alterazione cerebrale legata a deposizione di amiloide e quindi Alzheimer, perché c'è una triplicazione del cromosoma che formerà più precursore. Queste sono le ragioni genetiche.

Ragione metaboliche

E nel caso dei due terzi di malattia dovuta non a mutazioni ma a eventi esterni? Qui la situazione si fa più difficile, ci sono molti studi ma è difficile focalizzare il problema; però sicuramente qualcosa si sta evolvendo e si è visto che le ragioni metaboliche sono legate essenzialmente ad alterazioni del metabolismo glucidico e ad alterazioni di tipo circolatorio, quindi ischemia, carenza di nutrizione al cervello. In condizioni come diabete o obesità in cui è alterato gravemente il metabolismo glucidico, oppure in condizioni in cui non c'è buona circolazione del cervello come l'arteriosclerosi, indurimenti delle arterie con formazione di placche che riducono l'afflusso di sangue in vari organi compreso in cervello. Si è visto che in queste situazioni può cambiare il metabolismo cerebrale e quindi cambia anche l'attivazione di proteasi, come non si sa, ma si è visto che a seconda del tipo di alterazione metabolica si attivano diverse serie di proteasi.

I fattori di rischio per un individuo qualsiasi, che non è quindi geneticamente predisposto, sono l'età (come appunto l'arteriosclerosi),traumi cerebrali, l'ipercolesterolemia (fattore di rischio per le arterie), ipertensione (fattore di rischio per la circolazione e per il cuore), l'arteriosclerosi, il fumo (che causa arteriosclerosi), l'obesità (massa corporea che sovraccarica il cuore,aumenta la pressione e rende precaria la circolazione generle), il diabete (alterazione del metabolismo glucidico che consegue all'obesità e ad una dieta sbagliata), carenza di vitamine e carenza di antiossidanti (vedete che il danno ossidativo può entrare anche qui).

Tutti questi fattori insieme evidenziano l'importanza della nostra alimentazione per la prevenzione di qualsiasi tipo di malattia, perché molti di questi fattori di rischio sono legati all'alimentazione: l'arteriosclerosi è legata all'alimentazione, l'ipertensione e l'obesità pure, quindi senza voler esagerare l'alimentazione corretta può prevenire moltissime malattie, inclusa la malattia dell'Alzheimer.

MECCANISMI DI DANNO NEURONALE

Una volta che si formano queste fibrille, come queste fibrille di amiloide beta uccidono i neuroni?

Con **due meccanismi di danno**:

-*uno diretto*, praticamente consiste nel fatto che queste fibrille possono stimolare direttamente i neuroni a produrre radicali liberi dell'ossigeno e liberare quantità di calcio che sono segnali per l'attivazione dell'apoptosi. Quindi le placche possono stimolare i meccanismi di apoptosi e far morire i neuroni, direttamente.

-C’è *un danno indiretto*, dato dal fatto che queste fibrille possono attivare la microglia, gli astrociti a produrre radicali liberi dell’ossigeno e dell’azoto e citochine e creare un danno e quindi questi mediatori vanno a danneggiare indirettamente i neuroni. (Su questo meccanismo indiretto c’è il lavoro del prof Cassatella).

Oltre alle placche, nell’Alzheimer c’è un altro tipo di lesione, a cui si dà un’importanza forse eccessiva: si formano dei gomitoli che vengono chiamati *fibrillary tangles* e questi gomitoli sono strutture che si trovano all’interno dei neuroni e che derivano dalla degenerazione dei microtubuli. In questi gomitoli si trova la **proteina tau**, questa nei neuroni normali è importante per controllare il trasporto assonico, e quindi si è visto che a seconda del suo grado di fosforilazione regola l’assemblaggio/ disassemblaggio dei microtubuli e quindi il movimento delle vescicole e della trasmissione sinaptica. Molti hanno detto che forse nella patogenesi dell’Alzheimer potrebbe esserci un’ alterazione della proteina tau: i topi privi di proteina tau si ammalano più difficilmente di Alzheimer; però vi dirò che la maggior parte delle pubblicazioni dice che la iperfosforilazione che si è osservata nella tau dell’Alzheimer e la sua associazione così iperfosforilata ai gomitoli è una lesione secondaria all’amiloide, cioè una conseguenza di quello che è il danno neuronale dovuto al taglio anomalo. Ve lo dico perché magari leggete qualche articolo che dà importanza alla tau, ve lo dico perchè ci sono due campane e dovete rendervi conto che di molte malattie molti aspetti sono ancora oscuri.

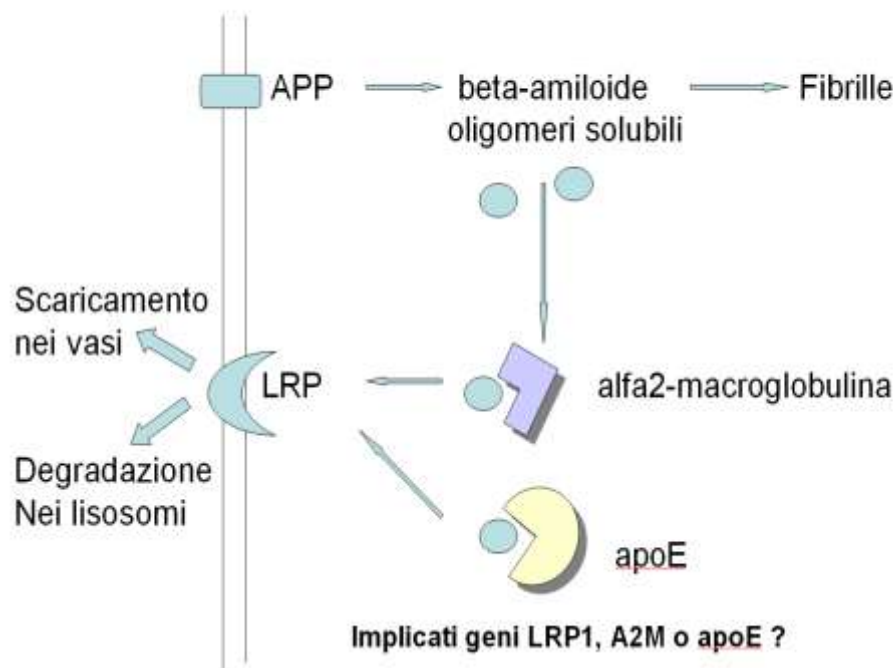
Quindi i neuroni vengono danneggiati dall’amiloide beta e degenerano.

AGGREGAZIONE DELL’AMILOIDE BETA

C’è però un’ulteriore aggiunta a questo discorso, negli studi più recenti si è visto che l’amiloide beta ha vari stadi di aggregazione: esiste l’amiloide beta solubile, quella tagliata normalmente e esiste quella insolubile, che forma le placche, però c’è anche una forma intermedia che è formata da oligomeri solubili. Mi spiego, torniamo al precursore, APP, abbiamo detto che se è tagliato da alfa e gamma secretasi si forma un’amiloide in forma di monomeri e non si ha né aggregazione né tossicità, è la forma normale. Se si attivano le beta secretasi si formano gli aggregati insolubili; però si è visto recentemente che prima di formarsi delle fibrille insolubili sotto forma di placche, c’è una forma intermedia caratterizzata da aggregati di oligomeri ancora solubili, che possono ancora muoversi, e questi oligomeri, si è scoperto, possono legare dei siti specifici a livello della sinapsi con alterazioni della trasmissione nervosa, perché possono alterare l’omeostasi del calcio, indurre la produzione di radicali liberi dell’ossigeno, che danneggiano i terminali neuronali, inducono il rilascio di certe neurotrasmettitori determinano la iperfosforilazione della proteina tau, che non si sa se è la causa della lesione, e inoltre alterano i recettori per il glutammato, recettori eccitatori (infatti molti dicono che la ipereccitabilità o eccito-tossicità da glutammato può essere causa anche della malattia di Alzheimer). A questo punto si dice che già nelle fasi di oligomerizzazione iniziale cominciano ad esserci delle alterazioni cognitive da parte del paziente, perché questi cominciano ad alterare la funzionalità del cervello, dei neuroni. L’ulteriore aggregazione poi di questi oligomeri solubili porta alla formazione di fibrille insolubile che formano le placche. È importante questa parte intermedia, passaggio intermedio con disfunzione neuronale causata da questi oligomeri.

LDL RECEPTOR RELATED PROTEIN (LRP)

Questa storia degli oligomeri insolubili è diventata ancora più interessante perché si è scoperto che esistono dei sistemi che finché questi oligomeri restano solubili possono eliminarli; sono quindi interessanti sia dal punto di vista patogenetico che terapeutico.

Funziona così, vi ho fatto questo schemino (*riferimento alla diapositiva*):

L'APP viene tagliato prima in forma di oligomeri solubili che poi si organizzano in fibrille; gli oligomeri solubili sono quelli che già danneggiano la trasmissione sinaptica per i motivi di cui sopra. Questi oligomeri solubili possono legare alcune proteine del cervello, per esempio l'alfa 2 macroglobulina, che è una proteina che è un inibitore di proteasi, ed è prodotta dal fegato oppure l'apoproteina E, l'apoE, che serve per solubilizzare le lipoproteine (è l'apoproteina delle VLDL, delle LDL, dei chilomicroni), e una volta legati questi oligomeri solubili a queste due proteine possono legare recettori LRP, che sta per *lipoprotein recepto-related protein,* cioè recettore correlato ai recettori delle lipoproteine delle LDL. Normalmente questo LRP serve, come dice il nome, prevalentemente a trasportare dentro e fuori dal circolo cerebrale le lipoproteine, quindi serve al metabolismo delle lipoproteine essenzialmente, tanto è vero che si è visto che è importante per lo sviluppo neuronale, per il normale metabolismo neuronale. Questo LRP però non solo serve per le lipoproteine, ma serve anche per spostare e eliminare altre proteine, per esempio proteasi, l'eme, e quindi in pratica serve per catturare vari tipi di proteine e di lipoproteine sulla faccia interna dell'endoteliocita, quella verso il cervello,perché LRP si trova sulla faccia interna del capillare e prendendo da lì queste proteine le può o trasportare all'interno dell'endoteliocita e portarle a degradarle nei lisosomi o per transcitosi, farle passare per tutto lo spessore dell'endoteliocita e scaricarle fuori nel circolo del sangue. In poche parole è un recettore che serve per o degradare o scaricare fuori dal cervello, e quindi di nuovo in circolo, proteine di vario genere tra cui anche le lipoproteine e tra cui i beta amiloide oligomeri.

Quindi è un recettore importante perché è lo "spazino" che prende gli oligomeri dal cervello e li butta fuori. Se si riesce ad agire su questo recettore si potrebbe riuscire a spazzar via tutti gli oligomeri prima che si organizzino in fibrille e facciano danno. Viceversa questo può essere importante anche nella patogenesi della malattia, perché i ricercatori si sono chiesti per prima cosa: "esistono forme di Alzheimer dovute ad alterazione della capacità scavenger dell'LRP? Cioè all'incapacità di questo sistema di scaricare fuori l'amiloide?" Su questo si sta lavorando, ed alcuni dicono addirittura che LRP può legare gli oligomeri solubili direttamente, solo che li lega meglio se sono legati all'alfa 2macroglobulina e all' apo E altra domanda: ci sono forme dell'amiloidosi cerebrale legate ad alterazioni dell'apoE e dell'alfa 2 macroglobulina? Allora adesso si stanno studiando tutte le correlazioni tra attività dei geni che codificano per l'apo E, per l'alfa 2 e per LRP, per vedere se c'è correlazione tra la malattia di Alzheimer, l'andamento della malattia, il determinismo della malattia etc e queste tre proteine, che servirebbero per portare fuori o portare alla degradazione la proteina dell'Alzheimer. Si è visto che ci sono alcune correlazioni, non con tutte queste proteine, ma diciamo si sono trovati alcuni polimorfismi interessanti. Quindi in pratica gli studi del domani serviranno per capire se si può potenziare questo sistema dell'eliminazione della beta amiloide prima che crei grossi danni.

Con questo ho detto le cose essenziali sull'Alzheimer, poi va approfondito sui libri.Alzheimer, malattia incurabile, di difficile diagnosi, in genere questa viene effettuata grazie alle TAC perché si vedono le placche e le zone di lesione cerebrale. Si cerca di isolare, ma non sempre ci si riesce, la beta amiloide dal liquido cefalorachidiano del paziente, ma essendo in circolo in piccole quantità non è sempre agevole. Si sta studiando non solo per curarla ma anche per migliore l'identificazione precisa di questa malattia gravissima.

CARATTERISTICHE CLINICHE DELL'AMILOIDOSI

Torniamo all'amiloidosi in generale; quali sono le caratteristiche cliniche dell'amiloidosi? Vi ripeto che non esiste una sintomatologia generale, perché *non è una malattia*, è una serie di diverse alterazioni formata da una serie di diverse proteine, che quindi creano diversi danni a seconda del tipo delle proteine e delle posizioni. Quindi i sintomi dipendono dal tipo di amiloide, dal tipo di fibrille e ovviamente da dove si depositano. In pratica nel caso di deposizione

-nel rene: avremo la proteinuria, cioè perdita di proteine per alterata funzionalità renale, e ipertensione nefrovascolare;

-nel fegato: ingrossamento, aumento della fosfatasi alcalina, trovate gli enzimi del danno epatico aumentati nel sangue, e raramente altre alterazioni funzionali

-nel cuore: cardiomegalia con alterazione delle valvole seguite da aritmie,

-nella cute: ci sono questi noduli che hanno localizzazioni abbastanza caratteristiche a livello delle ascelle, dell'inguine, della faccia, del collo e porpora, cioè chiazze di emorragia, per alterazione dei vasi dermici

-intestino: si va dalla costipazione per rallentamento intestinale, visto che questo, infarcito di amiloide, non riesce più a muoversi bene e spingere avanti il materiale alimentare; ulcerazioni con fenomeni di malassorbimento, fino all'emorragia e alla diarrea nei casi più gravi

-sistema nervoso: neuropatie periferiche, alterazione dei glomi carotidei quindi con problemi di ipotensione posturale, vuol dire che manca in normale controllo da parte dei glomi nel passaggio da seduti a stazione eretta con tendenza a vertigini quando ci si alza in piedi; difetti di sudorazione, fino a incontinenza sfinterica nei casi più gravi.

- A livello del sistema endocrino: turbe della tiroide, dei surreni etc

- Articolazioni: irrigidimento e difficoltà

Questo perché, quando sarete medici, se in un paziente con una malattia che può essere la tubercolosi, l'artrite reumatoide, un tumore del rene, se accanto ai sintomi del tumore vedete comparire alcuni di questi sintomi qua, vuol dire che altri organi evidentemente cominciano ad avere accumuli di amiloide e se siete bravi medici andate a controllare se c'è un interessamento di questi organi a livello collaterale.

DIAGNOSI

Per la diagnosi di sicurezza non basta fare la palpazione dell'organo oppure la TAC, o topografia e vedere che c'è una megalia dell'organo; ma la diagnosi di certezza la faccio solo con biopsia, prelievo del tessuto malato con un ago e andare a fare una colorazione specifica che è quella col rosso congo, che rivela, in colore rosso vivo, l'amiloide. Si può fare anche l'elettroforesi delle proteine, per vedere che tipo di proteina ci sia. Per esempio per l'amiloidosi AL per identificare le immunoglobuline, siccome si separano nel campo elettrico le proteine si vede di che tipo di proteina si tratta. (per esempio Se voi trovate delle Ig depositate nella cute si tratta di amiloidosi). Poi ancora, una cosa di anatomia patologica, a livello anatomico prima gli organi tendono ad ingrossarsi per deposito di questo materiale amorfo e ialino nel loro interstizio, quindi abbiamo ingrossamento della milza, del fegato, dei reni, ispessimento della cute, poi però dato che l' amiloide tende a depositarsi intorno a vasi sanguigni questo crea un'alterazione degli scambi trofici e quindi passiamo da megalia ad atrofia, diminuzione di volume per morte delle cellule. L' amiloidosi si deposita nello stroma di supporto degli organi, su alcuni libri trovate che vengono descritti i vari quadri anatomopatologici della deposizione dell'amiloide, per quanto riguarda la nostra materia questo interessa poco perché in realtà ci sono tantissimi quadri diversi che dipendono dalla diversa organizzazione stromale dei diversi organi (il quadro si vede sempre uguale se hanno tutti la stessa disposizione stromale). In realtà siccome ci sono differenze morfologiche a livello dello stroma della milza, per esempio, rispetto a quello del fegato o della tiroide, vedrete quadri completamente diversi delle deposizioni. Siccome sono stati chiamati con vari nomi i diversi tipi di depositi, a me basta che capiate che si tratta di amiloide e la differente struttura è dovuta semplicemente al fatto che diverge la struttura dell'organo, non tanto la struttura della deposizione di amiloide. La deposizione è di solito perivascolare all'inizio, perché abbiamo visto che molte amiloidosi sono di origine ematica, quindi prima si depositano intorno ai vasi e poi si diffondono a tutto lo stroma.

Dell'amiloidosi avrete una visualizzazione perché a esercitazione vi farò vedere due vetrini di amiloidosi: una della milza e una del fegato.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 31/10/2012

Patologia – prof. Berton

Lezione del 31/10/2012

Sbobinatore: Silvia Grandi

Revisore: Enrico Tadiello

LA COAGULAZIONE SANGUIGNA

(Le slide commentate in questa lezione si trovano nel file lez_5-coagulazione_sanguigna)

Nell'attivazione della coagulazione sanguigna possono essere schematizzate tre tappe: la via estrinseca, la via intrinseca e la via comune.

VIA COMUNE

*(cfr slide 7)*Partiamo dalla via comune che è la via su cui convergono sia la via estrinseca che la via intrinseca ed è costituita da un complesso tra il **fattore X** (zimogeno) e il **fattore V** (cofattore), che vedremo essere bersaglio del sistema di regolazione della coagulazione. Questi fattori, che interagiscono in modo calcio-dipendente, si contattano con i fosfolipidi della superficie piastrinica, in particolare con la fosfatidilserina che viene esposta sulla superficie esterna della via estrinseca in seguito all'aggregazione (questo può avvenire anche su altre cellule per esempio del tessuto danneggiato). (*non si capisce bene, il prof. non è chiaro Ndr*)

Gli enzimi sono tutti zimogeni. Gli **zimogeni sono tutti enzimi calcio-dipendenti**. Questa calcio dipendenza spiega anche l'importanza della modificazione post traduzionale a cui abbiamo accennato nella lezione precedente, catalizzata dalla vitamina K.

Il complesso X-V lega un altro zimogeno, la **protrombina**, che viene convertita in **trombina**. La trombina è un enzima chiave del sistema coagulativo, innanzitutto perché forma la rete di fibrine insolubile. La trombina ha come substrato il fibrinogeno che viene clivato liberando dei peptidi, chiamati fibrino peptidi, che hanno anche una serie di azioni biologiche aggiuntive che vedrete. I monomeri di fibrina si aggregano a formare polimeri. Questi polimeri vengono poi stabilizzati da legami covalenti, e questa azione è mediata da un enzima che ha un'azione transglutamminasica, chiamato fattore XIII, che è uno dei fattori della coagulazione.

La trombina come vedremo non ha soltanto questo ruolo: è un enzima chiave nell'amplificare in un circuito di feedback positivo diverse tappe della coagulazione sanguigna e dell'aggregazione piastrinica. La trombina è un potente aggregante piastrinico e agisce anche su altri fattori: per esempio è in grado di attivare il fattore V e favorire la sua interazione con il fattore X.

Attivazione della via estrinseca.

La via estrinseca è attivata dal **fattore tissutale (TF)**. Vi sono diverse fonti del fattore tissutale, alcune delle quali erano riassunte nella figura mostrata nella lezione precedente.

Il fattore tissutale è espresso da diverse cellule dei tessuti: sistema nervoso, epiteli, ecc. E' espresso anche in queste particolari microparticelle, la cui scoperta è stata un po' controversa, però è oggi accettata. Queste **microparticelle**, la cui origine resta controversa, sono vescicole liberate da cellule della linea mieloide, in particolare dai monociti. Hanno una caratteristica che ne individua in parte l'origine in una cellula di tipo leucocitario. Sembrerebbe infatti che le cellule monocitarie siano le maggiori produttrici di TF, nel senso che esprimono una molecola detta PSGL1. Il **PSGL1**, il cui acronimo sta per P Selective Glicoprotein Ligand 1, è una mucina, cioè una glicoproteina fortemente glicosilata. Il PSGL1 è un ligando elettivo per le selettine endoteliali nel contesto del reclutamento leucocitario, ma è anche un ligando per la P selettina, che viene espressa dalle piastrine successivamente all'aggregazione.

La P selettina fa parte della membrana dei granuli alfa. Successivamente alla fusione granulo membrana della piastrina, che si verifica nel contesto dell'aggregazione, le piastrine espongono P selettina. *(cfr slide 8)* Questa è in grado di concentrare, proprio nella sede in cui si sta formando il tappo piastrinico (quindi è già partita l'emostasi primaria), **le micro particelle, riconoscendo PSGL-1, e queste micro particelle esprimono il fattore tissutale**. Quindi questa è la seconda fonte del fattore tissutale, che verrebbe quindi concentrato nella sede in cui è necessario, cioè nella sede in cui si è già formato il tappo piastrinico ed è quindi necessario stabilizzare l'adesione piastrinica con la formazione del polimero di fibrina polimerizzata.

Una seconda fonte di più recente scoperta del fattore tissutale **è rappresentata dalle piastrine stesse**. Anche qui non è del tutto chiaro, come emerge da questa figura *(cfr slide 9)*, quale sia l'origine del fattore tissutale che potrebbe essere espresso dalle piastrine. Potrebbe derivare dalle microparticelle, potrebbe essere successivo all'interazione con le micro particelle o potrebbe essere internalizzato in alfa granuli sempre derivanti dalle micro particelle. Un'altra importante fonte è rappresentata dal fatto che la piastrina eredita dai megacariociti un pool di RNA messaggeri. Tra le diverse centinaia di messaggeri presenti nelle piastrine è stato identificato un messaggero (mRNA) che codifica per la sintesi del fattore tissutale e che può essere sintetizzato e poi veicolato nei granuli, quindi esposto successivamente alla degranulazione oppure essere direttamente esposto sulla superficie piastrinica.

Quindi sia la caratterizzazione delle microparticelle, sia l'esposizione del fattore tissutale da parte delle piastrine (in particolare piastrine aggregate), nei fatti modifica sostanzialmente (anche se per una serie di motivi pratici si conserva questa distinzione) il concetto di estrinseco e intrinseco. Nel senso che classicamente la via estrinseca è una via di contatto del plasma con una molecola che è fuori dal vaso, come abbiamo visto però il fattore tissutale è anche all'interno del vaso (o presente in micro particelle o esposto da piastrine o in particolari condizioni sintetizzato ed esposto da cellule endoteliali).

VIA ESTRINSECA *(cfr slide 10)*

La via estrinseca è una via che richiede un'interazione diretta tra il **fattore VII** e il **fattore tissutale**. TF è una sorta di cofattore per i fattori della cascata coagulativa.

Uno dei primi bersagli (substrati) del fattore VII attivato è costituito dal fattore X, il quale viene clivato mediante parziale digestione proteolitica da parte del fattore VII. In questa forma il fattore X può quindi interagire con il fattore V e quindi attivare la via comune.

VIA INTRINSECA *(cfr slide 11)*

La via intrinseca classicamente è una via che richiede l'intervento di più componenti. Nella sua forma classica origina dall'attivazione del **fattore XII** (fattore di Areman) che agisce sul **fattore XI.** Il fattore XI ha come substrato il **fattore IX** che forma un altro complesso critico nella cascata coagulativa, cioè quello con il **fattore VIII.** Questi due fattori attivano il fattore X e quindi la via comune.

L'importanza della via intrinseca per molto tempo è stata sostenuta dall'osservazione che mutazioni nei geni che codificano per il fattore VIII e per il fattore IX sono responsabili delle due forme di emofilia, rispettivamente l'emofilia A e l'emofilia B, che sono dal punto di vista clinico le **due più importanti coagulopatie della popolazione umana**.

VIE DI ATTIVAZIONE DELLA COAGULAZIONE IN VIVO:

1. ***1. TF E VIIa POSSONO ATTIVARE IL FATTORE IX*** (cfr slide 13)

La via intrinseca è stata nel corso degli anni messa in discussione, soprattutto sulla base dell'evidenza che sono stati identificati pazienti con difetti del fattore XII che non presentano gravi emorragie. La normale emostasi coagulativa in soggetti con mutazioni del gene codificante per il fattore XII e anche in parte codificanti per il fattore XI, accoppiata invece alla mancata reazione emostatica in pazienti con mutazioni dei geni codificanti per il fattore VIII e il fattore IX, impose la ricerca di nuovi meccanismi di attivazione della coagulazione sanguigna in vivo, nel senso che questa via non sembrava essere una via per lo meno predominante in vivo.

La prima conclusione che venne tratta è che in realtà il **complesso TF-fattore VII soltanto** in condizioni particolari, cioè **in eccesso di TF** *(cfr slide 13)*, **può attivare direttamente la via comune,** altrimenti in realtà si arriva all'attivazione della via comune attraverso l'attivazione dei fattori IX e VIII. Questo è quindi un primo meccanismo di attivazione della coagulazione in

vivo che va sottolineato. Questo fa tornare i conti perché spiega perché difetti dei geni codificanti per questi due fattori (fattori VIII e IX) alterano la coagulazione in vivo mentre i difetti del fattore XII **non** la alterano.

Questo schema, paradossalmente, in parte non vale nell'ambito della diagnostica di laboratorio della coagulazione.

I test che si usano per valutare la coagulazione in vivo sono prevalentemente due. Uno di questi test, il **tempo di Quick o di protrombina**, calcola il tempo di Quick (detto anche prothrombing time) e viene usato per diagnosticare diverse patologie della coagulazione sanguigna e in particolare per monitorare pazienti trattati con cumarinici(Warfarin). Questo test misura l'attivazione della via estrinseca classica, cioè di quella via che attraverso il fattore tissutale e il fattore VII va direttamente nella via comune. Questo in quanto in vitro (quando voi fate un prelievo di sangue, lo anticoagulate con un sistema che vedremo e poi fate ripartire il processo coagulativo) non è possibile dosare la quantità di fattore tissutale in modo tale da andare lungo questa via (*TF-fattore VII fattore IX, NdR*) e la quantità di TF che viene aggiunto è in eccesso e attiva direttamente la via comune. Questo dice perché questo test, il tempo di protrombina o tempo di quick, (dal nome di un brillante studente che fece una tesi di laurea descrivendo questa tecnica di diagnostica di laboratorio), viene **usato per diagnosticare i difetti del fattore VII e tutti i difetti dei fattori che fanno parte della via comune**. Se questa via è alterata, tutto il sistema di attivazione che origina dal fattore VII che interagisce con TF e tutta la via comune sono alterati.

Prima di vedere altre situazioni che possono attivare in vivo la coagulazione, oltre a questa che è la via predominante in condizioni fisiologiche, è cioè il meccanismo emostatico principale, torniamo alla via intrinseca per definire alcuni aspetti dei meccanismi di attivazione della via intrinseca, che hanno un significato anche in vivo, in particolare in alcune situazioni patologiche.

Meccanismi di attivazione della via intrinseca: SISTEMA DI ATTIVAZIONE DA CONTATTO *(cfr slide12)*

L'attivazione del fattore XII e della via intrinseca avviene nel contesto di quello che è definito sistema di attivazione da contatto, che è un meccanismo di attivazione di diversi sistemi polimolecolari solubili.

Questo sistema d'attivazione da contatto nella forma più classica e semplice è dovuto all'interazione di proteine plasmatiche con il **collagene sottoendoteliale**, cioè è un fenomeno che si verifica in qualsiasi condizione si sviluppi un danno tissutale che comporta un danno alla parete del vaso e quindi l'esposizione del tessuto connettivo sottoendoteliale.

Di questo sistema da contatto, di cui esistono altri meccanismi di attivazione, fanno parte altri zimogeni che non fanno parte del sistema coagulativo, per esempio la **precallicreina** nella forma zimogeno che viene convertita in callicreina attiva.

La **callicreina** ha diversi tipi di substrato:

- il **chininogeno ad alto peso molecolare**, il quale viene clivato per formare delle molecole, le chinine, importanti nel processo infiammatorio perché sono molecole vasoattive che determinano la vasodilatazione.
- Il **fattore XII**. C'è un'attivazione reciproca da parte del fattore XII attivato in seguito al contatto. Il fattore XII viene attivato dalla callicreina e nella forma attiva il fattore XII (XIIa) a sua volta accelera ulteriormente la conversione della precallicreina in callicreina.
- Il **plasminogeno**. C'è anche l'attivazione di un sistema inibitorio della coagulazione perché la callicreina può convertire il plasminogeno in plasmina attivando quindi il sistema fibrinolitico.

Un'altra cosa che è importante sottolineare è che *il sistema da contatto può essere attivato non soltanto dal collagene sottoendoteliale, ma anche dalla via intrinseca, dalla via dipendente dalla callicreina e da tutta una serie di altre cariche negative*. Tra queste **molecole cariche negativamente** ci sono per esempio i polifosfati, contenuti nei granuli densi piastrinici, e vi sono anche molecole di RNA. Questo nel contesto del danno tissutale, della risposta al danno e quindi dei processi riparativi. Vi sono anche **superfici di microrganismi**.

Sottolineo questo elemento perché ci sono una serie di evidenze che implicherebbero un'abnorme attivazione del sistema da contatto, in particolare della via intrinseca classica della coagulazione, in processi patologici di cui il prototipo più classico e importante dal punto di vista clinico è rappresentato dallo shock settico.

Lo **shock**, dando una breve definizione, è un'importante alterazione del metabolismo di diversi tessuti, dovuta a un ridotto apporto di sangue a diversi tessuti in seguito a collasso cardiocircolatorio.

Lo **shock settico** è un tipo particolare di shock dovuto alla presenza di microrganismi o di loro componenti, in particolare di tossine batteriche e lipopolisaccaridi (LPS) nel circolo sanguigno. Viene classificato all'interno degli shock cosiddetti distributivi,

vale a dire quegli shocks che sono dovuti primariamente a una marcata vasodilatazione sia delle arteriole dei tessuti periferici sia dall'apertura degli sfinteri dei capillari. Questo shock ha una patogenesi molto particolare che viene definita con l'acronimo **SIRS,** che sta per **Systemic Inflammatory Response Syndrom**, cioè sindrome di risposta infiammatoria sistemica. Questo tipo di shock è tipicamente caratterizzato da un'importante complicanza che viene definita **Coagulazione Intravascolare Disseminata** o **CID** o DIC, dal termine anglosassone Disseminated Intravascular Coagulation. Questa situazione di coagulazione intravascolare disseminata è dovuta ad un'abnorme attivazione del sistema della via intrinseca da parte di componenti batteriche direttamente e da parte di connettivo sottoendoteliale che viene abnormemente esposto al plasma. Questo è dovuto allo sviluppo, nel corso di questa infiammazione sistemica, di fenomeni di danno all'endotelio e di contrazione delle cellule endoteliali, quindi di esposizione del tessuto connettivo non in un sito ristretto ma in tutto il circolo.

Vi accenno a questa problematica soltanto per dire che l'osservazione che i soggetti con mutazione del gene che codifica per il fattore XII non hanno gravi complicanze emorragiche, combinata con l'osservazione che l'attivazione del fattore XII e quindi della via intrinseca è molto importante nello shock settico, sta stimolando molte ricerche finalizzate ad ottenere degli inibitori selettivi del fattore XII. Questo perché in queste patologie bloccare l'attivazione del fattore XII potrebbe ridurre un'importante complicanza, cioè un'abnorme attivazione del sistema coagulativo senza altre complicanze durante la patologia rappresentate da fenomeni di tipo emorragico. Questa ricerca è sicuramente facilitata dal fatto che sono stati oggi identificati una serie di inibitori selettivi di alcuni fattori della coagulazione, in particolare della trombina (sulla rassegna caricata sul sito dell'e-learning sono identificati alcuni degli inibitori selettivi).

Questa **attivazione della via intrinseca da parte di cariche negative è il meccanismo di attivazione del processo coagulativo che avviene tipicamente in vitro.** Quando prelevate il sangue e lo mettete in una provetta coagula, in quanto le superfici di plastica e di vetro hanno una carica negativa prevalente. Questa attivazione è il meccanismo che si usa per diagnosticare difetti del processo coagulativo dovuti ad alterazione di componenti della via intrinseca classica. Detta in altri termini ho detto prima che il tempo di protrombina, prothrombin time, è basato sulla stimolazione del processo coagulativo in test tube, ossia in provetta, con l'aggiunta di un'elevata quantità del fattore tissutale che attiva direttamente la via comune. Resta il problema di come si diagnostica la carenza del fattore IX e VIII ed eventualmente degli altri fattori che sono a monte di questi, il fattore XII e XI. Questa si diagnostica utilizzando un altro test che selettivamente attiva questo tipo di via intrinseca anche se l'importanza di questa classica via intrinseca in vitro è relativamente limitata. Questa cosa è possibile perché si usano artificialmente delle particelle cariche negativamente che vengono aggiunte alla provetta e innescano il processo coagulativo attraverso la via classica intrinseca. Questo test si chiama **APTT** ed **è in grado di misurare tutti i difetti della via intrinseca**, compresi i difetti del fattore VIII e del fattore IX più ovviamente quelli della via comune. I due test non differenziano sui difetti della via comune dove comunque, per indurre la formazione del coagulo, devono convergere. Sono però utili per diagnosticare separatamente il difetto di questi quattro fattori rispetto al difetto del fattore VII. APTT sta per Activated Partial Thromboplastin Time, tempo di tromboplastina parziale attivato.

LA COAGULAZIONE IN VIVO:

1. ***1. TF E VIIa POSSONO ATTIVARE IL FATTORE IX***

TF e fattore VII attivano fattore IX e VIII e quindi si ha poi la convergenza nella via comune.

1. ***2. TROMBINA ATTIVATA PUO' ATTIVARE XI LEGATO A SUPERFICIE PIASTRINICA***

La <u>slide 14</u> riassume altri meccanismi aggiuntivi che riportano ad un concetto importante anticipato prima. La trombina agisce in generale con meccanismi di feedback negativo. Per esempio è stato visto che il fattore XI, una componente classica della via intrinseca, può essere adsorbito sulla superficie delle piastrine attivate e può essere attivato da trombina. La sua attivazione determina quindi l'attivazione del fattore IX e del fattore VIII. C'è anche una via di attivazione intrinseca indipendente dal fattore XII da un certo punto di vista.

1. ***3. IN CONDIZIONI DI ABNORME ATTIVAZIONE DEL FATTORE XII (esposizione di sottoendotelio negli shock settici), QUESTI PUO' SVOLGERE UN RUOLO ATTIVATORIO DIRETTO O INDIRETTO*** *<u>(cfr slide 15)</u>*

Riassumendo, nel punto 1 abbiamo un'azione diretta del fattore VII sul fattore IX e poi si forma il complesso nono-ottavo; nel punto 2 la trombina attiva il fattore XI che poi attiva il fattore IX e si forma il complesso nono – ottavo. Esso attiva poi la via comune classica che si basa sul fattore X e sul fattore V.

In un contesto patologico possiamo avere un'abnorme attivazione del fattore XII. Questo fattore XII è in questo caso l'attivatore tradizionale della via intrinseca, agisce sul fattore XI che poi agisce sul fattore IX. E' stato visto che quest'abnorme attivazione del fattore XII può anche convergere in un potenziamento dell'attivazione della via estrinseca agendo sul fattore VII. Questo è al momento considerato prevalentemente un fenomeno di tipo patologico e per questo c'è molto interesse a definire inibitori selettivi del fattore XII che quindi lasciano intatti i meccanismi fisiologici di attivazione della coagulazione sanguigna. La slide 15 riassume questo concetto.

TROMBINA *(cfr slide 17)*

Torno un attimo sulla trombina per sottolineare come la trombina in realtà ha diverse azioni biologiche.

- Svolge una funzione essenziale nel processo coagulativo (come visto prima), nel senso che **converte il fibrinogeno in fibrina e** poi **amplifica il processo coagulativo** attraverso diversi meccanismi. Come abbiamo visto agisce sul fattore XI che come mostrato nello schema precedente (slide 14) può attivare il fattore V.
- È una molecola che ha diverse funzioni pleiotropiche, in quanto è una molecola solubile che viene riconosciuta da recettori specifici posti su moltissime cellule. Per esempio è un **potente aggregante piastrinico,** riconosciuto da recettori espressi sulle piastrine, e **stimola** inoltre **la formazione di** altri aggreganti come i **PAF in cellule endoteliali** dove ci cono recettori per la trombina con diverse funzioni.
- La trombina **nelle cellule endoteliali stimola l'espressione di molecole adesive**. Questo fenomeno è importante anche per questo intreccio che c'è sempre nei fenomeni reattivi tra risposta infiammatoria e risposta coagulativa.
- Ha anche **un'azione mitogena diretta e indiretta.** Il processo riparativo ancora una volta guarda lontano, nel senso che stimola processi di rigenerazione dei tessuti favorendo la proliferazione cellulare.
- Infine la trombina ha un'azione paradosso nel senso che, **legata ad un particolare recettore presente sulla superficie delle cellule endoteliali, attiva sistemi ad azione anticoagulante**. Questo è un importante sistema di regolazione del processo coagulativo.

MECCANISMI DI REGOLAZIONE NEGATIVA DELLA COAGULAZIONE SANGUIGNA *(cfr slide 18)*

La regolazione della coagulazione sanguigna è un fenomeno molto importante. Vedremo come alcune patologie della regolazione della coagulazione sanguigna si ripercuotono in una maggiore probabilità di sviluppare lesioni tromboemboliche con conseguenze cliniche anche importanti.

I meccanismi inibitori riflettono strettamente il meccanismo con cui la coagulazione sanguigna è regolata.

1. **Inibitori dell'attivazione**

Un primo sistema di regolazione della coagulazione sanguigna è proprio a livello di inibizione dell'attivazione. Per il ruolo fondamentale che il fattore tissutale ha nell'attivazione della coagulazione sanguigna, il bersaglio di questo sistema inibitore , chiamato **Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)**, è quello di legarsi al TF e di impedire l'interazione con il fattore VII, che è richiesta perché venga poi attivato il complesso nono-ottavo o direttamente il fattore X.

1. **Inibitori degli zimogeni attivati (SERPINE)**

Il secondo gruppo di inibitori sono inibitori di proteasi. Sono complessivamente chiamate serpine, serin protease inhibitors, perché sono inibitori di serin proteasi come gli zimogeni attivati. Ve ne sono diversi, in particolare il più caratterizzato è l'**antitrombina III**. Inibiscono gli zimogeni attivati, cioè la trombina, il fattore X e il fattore IX prevalentemente, ma anche il fattore VII. La peculiarità del sistema di inibizione basato sulle serpine è quella di essere finemente regolato da una classe di composti che sono i proteoglicani.

I **proteoglicani** sono componenti dei tessuti connettivi caratterizzati da una struttura con una sorta di scheletro proteico da cui si dipartono delle lunghe catene polisaccaridiche. I proteoglicani si classificano sulla base del fatto che le catene polisaccaridiche sono costituite da unità disaccaridiche che si ripetono anche centinaia di volte. Le proprietà fisico-chimiche dei proteoglicani conferiscono una certa elasticità a tutti i tessuti interstiziali, in quanto assorbono e si impregnano di acqua. In realtà i proteoglicani hanno altre funzioni e in particolare una funzione di legare molecole biologicamente attive sulla superficie dell'endotelio, modulandone la funzione. Questo è uno dei **grandi meccanismi che fa dell'endotelio una superficie anticoagulante in condizioni fisiologiche**, ovvero l'endotelio integro funzionale ha una spiccata attività anticoagulante. E' presente quello che viene anche chiamato glicocalice, cioè un endotelio ricoperto da molecole glicoproteiche, in particolare da un proteoglicano che è l'eparansolfato. L'eparansolfato lega le serpine, che sono inibitori di proteasi, e ne potenzia l'attività di diverse centinaia di volte. Se l'endotelio ha un appropriato strato di eparansolfato è in grado di inibire il processo coagulativo molto efficacemente. Questa capacità dei proteoglicani di modulare negativamente il processo coagulativo sta alla base del meccanismo d'azione di uno dei due fondamentali anticoagulanti che vengono usati in clinica, l'eparina.

L'***eparina*** è un proteoglicano con una struttura simile all'eparansolfato che agisce proprio perchè lega e potenzia l'azione dell'antitrombina III di 300-400 volte. L'unico problema di questo anticoagulante è che non è facile da dosare perché agisce come una spugna molecolare che lega e attiva le serpine e ne amplifica enormemente l'azione, quindi uno dei rischi dell'uso dell'eparina è rappresentato da un'inibizione eccessiva del processo coagulativo. L'eparina per sua struttura ha un'altra difficoltà ad uso clinico nel senso che può essere usata solo per via parenterale, quindi iniettata in circolo o in cateteri oppure sottocute, perché non può essere assunta per bocca.

1. **Inibitori di cofattori**

Il terzo sistema importante di regolazione negativa della coagulazione sanguigna ha come bersagli i cofattori, in particolare ha come bersagli il fattore V e il fattore VIII. Questo sistema inibitorio è quindi in grado di spegnere la via comune attraverso l'inibizione del fattore V e la via di attivazione del processo coagulativo attraverso l'inibizione del fattore VIII. Questo sistema è in realtà costituito da tre proteine, la cui organizzazione ricorda l'organizzazione del sistema coagulativo.

Una di queste, la **trombomodulina**, è, analogamente al fattore tissutale, non una proteina solubile ma una proteina di membrana. Questa proteina è un recettore per la trombina, è costitutivamente espressa sulla superficie dell'endotelio, può essere modulata nella sua espressione e quindi può incidere sull'efficacia maggiore o minore della superficie endoteliale che è una superficie anticoagulante.

Nella forma legata alla trombomodulina la trombina è incapace di degradare il fibrinogeno, ma come vedremo è in grado di attivare uno zimogeno, la proteina C, che nella forma attiva inibisce il fattore V e il fattore VIII.

Descriviamo meglio questo meccanismo: *(cfr slide19)* la trombina nella forma legata alla trombomodulina modifica la specificità di substrato, è in grado di modificare la **proteina C** che si trova legata ad un recettore endoteliale, il cosiddetto recettore endoteliale per la proteina c; il recettore endoteliale per la proteina C assieme alla **proteina S**, che può essere considerata il suo cofattore, agisce come proteasi sul fattore V e VIII, inattivandoli. La conclusione semplice che si ricava da questo schema è che in forma solubile la trombina può agire con un meccanismo a feedback positivo attivando per esempio il fattore V, mentre nella forma legata alla trombomodulina la trombina invece attiva questo sistema di inibizione che ha come bersaglio il fattore V e VIII.

Un importante livello di regolazione della funzione di questo sistema (ce ne sono altri che poi vedremo) è rappresentato dal fatto che l'espressione di trombomodulina sulla superficie dell'endotelio è regolata da una serie di citochine. Due citochine, che costituiscono le due classiche citochine proinfiammatorie, sono in grado di ridurre l'espressione di trombomodulina, riducendo le capacità anticoagulanti della superficie endoteliale e spostando l'equilibrio verso un aumento dei processi coagulativi. Ancora una volta si osserva questa interazione nei processi reattivi ad un danno che lavorano in modo coordinato, per cui l'infiammazione favorisce anche lo sviluppo del processo coagulativo stesso.

I prossimi due disegni *(cfr slide 20-21)*(questo fenomeno può essere visto in dettaglio nei file pdf caricati nell'e-learning) fanno vedere in termini dinamici come si verifica questo fenomeno. E' mostrata la trombomodulina che lega la trombina e agisce sulla proteina C, legata al recettore endoteliale per la proteina C, formando l'APC (questo acronimo sta per Activated Protein C ossia forma attiva di proteina C). La proteina C attivata è in grado di complessarsi alla proteina S e al fattore V, presente per esempio sulla superficie piastrinica, inattivandolo. Nella forma completa il complesso proteina C - proteina S è in grado di interagire anche

con il fattore VIII e determinarne l'inattivazione. Questo è un importante sistema anticoagulativo di cui vedremo l'importanza in patologia.

-

Piccola parentesi : **Gli istoni inducono danno endoteliale e vengono degradati** *(cfr slide 22)*

La proteina C attivata è stata recentemente apprezzata non soltanto per la sua capacità di agire in un contesto di tipo coagulativo, ma anche perché è in grado di digerire diversi tipi di altre molecole, in particolare è in grado di degradare gli istoni. Gli istoni sono una molecola che è stata identificata come molecola tossica per l'endotelio vascolare. Gli istoni vengono liberati nel corso di diversi processi reattivi, per esempio vengono liberati nel corso degli shock settici. In questa patologia l'attivazione massiva dei neutrofili e la formazione di neutrophil extracellular traps, di cui abbiamo parlato all'inizio di questo corso, fa in modo che vengano rilasciate grosse quantità di istoni. Questi, danneggiando l'endotelio vascolare, determinano una marcata esposizione del collagene sottoendoteliale e attivano abnormemente, con un meccanismo in questo caso indiretto, la via intrinseca della coagulazione. In realtà si è visto che la proteina C attivata, che è stata introdotta in terapia per ridurre l'eccesso di processo coagulativo negli shock settici, agisce soprattutto degradando gli istoni, che vengono liberati nel circolo nel corso delle sepsi e che possono danneggiare l'endotelio vascolare.

ORGANIZZAZIONE DEL SISTEMA FIBRINOLITICO *(cfr slide 23)*

Oltre a un processo di inibizione della cascata coagulativa esiste un sistema di degradazione del coagulo neoformato. Questo sistema è essenziale nel processo ripartivo perché altrimenti i nostri vasi nel corso della vita si riempirebbero di aggregati piastrinici e coaguli, con grosse ripercussioni sulla circolazione del sangue.

Questo sistema è il sistema fibrinolitico che è organizzato al solito modo, vale a dire richiede la conversione di uno zimogeno, cioè di una proteasi che è in forma inattiva nel plasma, in una forma attiva. Questa forma attiva è la **plasmina** che agisce sulla fibrina e la degrada generando dei frammenti solubili, che poi vengono rimossi da cellule mononucleate, in particolare dai monociti, e degradati. Questo è uno dei sistemi di degradazione del coagulo.

L'altro sistema è basato sull'azione diretta di cellule monocitarie che possono internalizzare piccoli frammenti di aggregati piastrinici, che vengono degradati successivamente alla degradazione della fibrina polimerizzata.

La conversione del plasminogeno in plasmina è sostenuta da una serie di molecole che vengono chiamate attivatori del plasminogeno, e ne esistono diverse classi. Questi attivatori del plasminogeno sono delle proteasi che determinano una parziale digestione proteolitica del plasminogeno convertendolo in plasmina. Il sistema per analogia con il sistema coagulativo ha anche dei versanti di inibizione, nel senso che ci sono inibitori degli attivatori del plasminogeno che riducono un abnorme attivazione di questo processo. Un inibitore di proteasi molto importante è l'**alfa 2 antiplasmina,** che circola nel plasma.

L'inibizione della plasmina liberata è molto importante in quanto la specificità di substrato della plasmina è relativa e la plasmina può agire su altre molecole. In particolare agisce sul fibrinogeno e su alcuni fattori della coagulazione, per esempio i due cofattori centrali, il fattore 5 e il fattore 8. Questo ci dice, come vedremo in alcuni esempi patologici, che un abnorme attivazione del sistema fibrinolitico è in grado di diminuire progressivamente l'efficienza del sistema coagulativo. Un abnorme attivazione del sistema fibrinolitico e quindi un abnorme formazione di plasmina comporta un rischio emorragico molto importante.

L'azione della plasmina libera (come vedremo la plasmina viene generata in forma legata al coagulo) **è inibita da alfa 2-antiplasmina circolante**, che però può essere saturata, in condizione in cui c'è un abnorme produzione di plasmina e questo può portare a un rischio emorragico importante.

Il sistema della plasmina può attivare il complemento (qui c'è un altro incrocio tra i sistemi polimolecolari solubili in questo caso tra il sistema fibrinolitico e il sistema del complemento). Può avere inoltre un'azione diretta e indiretta, quest'ultima mediata prevalentemente dall'attivazione di collagenasi e elastasi, in un contesto particolare che è la liberazione delle proteine della matrice extracellulare.

Una caratteristica che è stata enfatizzata nelle cellule neoplastiche maligne è l'elevata espressione di recettori per attivatori del plasminogeno sulla superficie. Un particolare tipo di attivatore del plasminogeno, chiamato di tipo 1 chinasi, nella forma legata al recettore può favorire la degradazione di proteine della matrice extracellulare e il movimento di queste cellule nell'interstizio tissutale. Questo mostra che l'attivazione di questo sistema ha un significato più ampio e non limitato al processo coagulativo.

Questo disegnino *(cfr slide 24)* mostra un aspetto centrale della regolazione intrinseca del sistema fibrinolitico rappresentato dal fatto che il sistema fibrinolitico viene attivato lì dove serve. Questo significa che il **plasminogeno si lega alla fibrina polimerizzata e viene convertito in plasmina attiva nel contesto del coagulo**, quindi la plasmina attiva normalmente agisce dove serve, cioè dove c'è il coagulo da degradare. Come illustra questo disegnino, se per default si forma della plasmina libera, e questo può succedere in varie situazioni, l'alfa 2-antiplasmina la lega e l'inibisce. Fino a quando c'è sufficiente alfa 2-antiplasmina libera, l'effetto della plasmina libera viene bloccato efficacemente.

PATOLOGIA DEL SISTEMA COAGULATIVO

Le patologie sono di due tipi: patologie genetiche e patologie acquisite.

-

ALTERAZIONI EREDITARIE DELLA COAGULAZIONE

Osservando questa tabella *(cfr slide 25)* (potete vedere una tabella aggiornata più dettagliata su diversi testi) si può notare che il difetto di singoli fattori è molto raro, con l'eccezione di difetti del fattore ottavo e nono che hanno una certa incidenza, rispettivamente 1 : 10000 l'**emofilia di tipo A** e 1 : 60000 l'**emofilia di tipo B**. Queste malattie sono trasmesse con un meccanismo legato al sesso e sostanzialmente colpiscono la popolazione maschile, basta infatti un allele mutato sul cromosoma x per determinare la comparsa della malattia.

La coagulopatia più diffusa è sicuramente la malattia di Von Willebrand. La **malattia di Von Willebrand** è trasmessa con un meccanismo autosomico dominante con un incidenza di uno su mille. Fenotipicamente c'è un'espressione di questa malattia molto diversa. Molte forme di malattia di Von Willebrand vengono scoperte per caso in soggetti che per sottoporsi a interventi chirurgici devono fare di routine i due test di coagulazione, APT e APTT. L'APTT nel caso di soggetti affetti dalla malattia di Von Willebrand risulta prolungato, perché l'APTT misura la classica via intrinseca quindi difetti del fattore XII, XI, IX o VIII. Il fattore di Von Willebrand (VWF) è importante non soltanto nel contesto dell'adesione piastrinica ma anche perché è il fattore che lega il fattore VIII. Il fattore VIII circola legato al VWF e ne determina la stabilizzazione e il reclutamento in seguito al danno vascolare nei siti del danno vascolare. Difetti del fattore di Von Willebrand di una certa gravità, sia in termini di espressione di proteina che di formazione di multimeri, comportano una sorta di emofilia A molto meno grave, nel senso che questi difetti convergono in una ridotta funzione del fattore VIII. Questa malattia fu scoperta da un medico che si accorse di coagulopatie che erano trasmesse con un meccanismo genetico diverso dalla classica emofilia.

-

***ALTERAZIONI ACQUISITE DELLA COAGULAZIONE** (cfr slide 22)*

Vi sono una serie di importanti alterazioni acquisite della coagulazione sanguigna, molte patologie sono molto comuni e comportano riduzioni della funzione coagulativa. Di seguito vediamo una classificazione dei difetti coagulativi.

1. **1. DIFETTI DI PRODUZIONE**

Tutti i fattori della coagulazione, a parte il fattore tissutale e il fattore di Von Willlebrand, sono sintetizzati nel fegato. Qualsiasi insufficienza epatica grave può quindi risultare in un difetto coagulativo. Soggetti con cirrosi epatica o altri tipi di insufficienza vengono costantemente monitorati per la funzione coagulativa e in certi casi sono richieste trasfusioni di plasma, cioè di fattori della coagulazione funzionanti da soggetti sani.

1. **2. DIFETTO DI APPROPRIATA MODIFICAZIONE POST-TRADUZIONALE**

Questo secondo gruppo di difetti rientra nelle deficienze di vitamina k. Questo gruppo di difetti è molto importante perché attualmente è una patologia di tipo iatrogeno dovuta all'uso di particolari farmaci, il cui meccanismo d'azione lo vedremo in seguito.

1. **3. AUMENTATO CONSUMO**

La **Coagulazione Intravascolare Disseminata CID** è un abnorme processo coagulativo che risulta alla fine in un consumo di fattori. Questa è una situazione analoga a quella che abbiamo visto con l'emostasi piastrinica, cioè abbiamo visto che il sistema emostatico può venire consumato da un'abnorme attivazione. Una caratteristica della coagulazione intravascolare disseminata è rappresentata dal fatto che può comparire come una patologia che comporta lesioni dovute a ostruzione del microcircolo per formazione di coaguli. Si formano quindi lesioni ischemiche dovute ad un eccesso di formazione di coaguli in diversi distretti. Questa patologia diventa particolarmente grave nelle fasi avanzate quando, in seguito alla formazione di microtrombi e a un consumo di fattori della coagulazione, il soggetto si trova in grave deficit, in particolare di fibrinogeno e questo può comportare importanti complicanze emorragiche.

1. **4. INATTIVAZIONE**

Nelle patologie autoimmunitarie e nei soggetti politrasfusi vi sono processi di inattivazione del sistema coagulativo che sono dovuti a anticorpi anti-fattori della coagulazione.

Un altro meccanismo di inibizione è l'eparina. Questa terapia può avere una serie di rischi soprattutto se usata per via endovenosa.

1. **5. IPERATTIVAZIONE DELLA FIBRINOLISI**

L'iperattivazione della fibrinolisi può comportare una ridotta funzione coagulativa. Un'abnorme formazione di plasmina e la saturazione del sistema inibitorio dell'alfa 2- antiplasmina comporta il fatto che la plasmina circolante degrada il fibrinogeno, provocando una sorta di patologia da consumo. Il fibrinogeno e altri fattori della coagulazione vengono degradati e quindi il soggetto è in difetto di funzione emostatica.

Riprendiamo il punto 2 per ricordare che la modificazione post-traduzionale degli zimogeni *(cfr slide 27)* rappresenta un evento centrale nel sistema coagulativo. Questa modificazione post-traduzionale è costituita dalla carbossilazione di un acido glutammico all'N-terminale degli zimogeni stessi. La carbossilazione serve a creare 2 cariche negative vicine che rappresentano un elemento essenziale per il legame del calcio che attiva la funzione enzimatica degli zimogeni. Senza la creazione di queste 2 cariche negative, che avviene attraverso il processo di carbossilazione di un residuo di acido glutammico che ha già un gruppo carbossilico, i fattori della coagulazione sono molto meno attivi. (Si può vedere la biochimica di questa reazione in qualsiasi testo di biochimica)

Questa reazione enzimatica è mediata da una carbossilasi che è vitamina k dipendente. Nel catalizzare questa reazione enzimatica la vitamina k viene convertita dalla forma idrochinonica alla forma epossidica e nella forma epossidata non è più attiva. Il sistema per funzionare ha bisogno di reduttasi che riconvertono la forma epossidica della vitamina k nella forma idrochinonica, cioè nella forma attiva. Queste reduttasi sono il bersaglio d'azione di uno dei farmaci più usati nell'ambito delle patologie vascolari che sono i cumarinici, tra i quali c'è ad esempio il cumadin, uno dei farmaci usati in questo campo. Inibendo queste reduttasi si inibisce progressivamente la capacità della carbossilasi di convertire gli zimogeni in forma attiva, mediante questa reazione di carbossilazione e quindi si inibisce il processo coagulativo. Questa è la terapia attualmente più usata per inibire il processo coagulativo in soggetti che hanno avuto tromboembolismi di una certa importanza. Questa terapia è usata anche per la sua facilità d'uso, nel senso che contrariamente all'eparina, i cumarinici possono essere assunti per via orale. Questa è quindi molto più semplice. Questa terapia richiede però un monitoraggio del processo coagulativo, nel senso che la terapia va aggiustata sulla base del risultato dei test (solitamente si fa il PT che è più semplice): se il tempo di Quick (o di protrombina) è abnormemente prolungato si riduce la quantità di farmaco; si aumenta la quantità di farmaco se il processo coagulativo è eccessivamente rapido perché nel soggetto vi sono condizioni che favoriscono questi eventi.

DEFICIENZE DI VITAMINA K *(cfr slide 28)*

Le deficienze di vitamina K sono molto rare se non si considerano quelle causate dall'uso di farmaci. Si osservano principalmente nelle seguenti situazioni:

1. **Sindromi da malassorbimento intestinale con steatorrea**.
2. **Deficit di funzione epatica con ridotta secrezione biliare**.

La vitamina K è una vitamina liposolubile quindi richiede sia i secreti pancreatici che epatici per venire efficacemente riassorbita.

1. **Insufficiente introduzione con la dieta**

Soggetti poveri di vitamina K sono per definizione i neonati. La vitamina k viene somministrata routinariamente nelle prime settimane di vita.

1. **Trattamento con farmaci antagonisti**

E' il motivo più importante.

Piccola parentesi: *(il professore dice che non occorre memorizzarla per l'esame e che può essere trovata nella rassegna che ha messo sul sito NdR) (cfr slide 29)* C'è un grande interesse a identificare nuovi inibitori della coagulazione sanguigna. Il warfarin, il coumadin, i coumarinici in genere hanno diversi bersagli. Questi inibitori non discriminano in quanto bloccano tutti gli zimogeni poiché la loro azione passa attraverso l'inibizione della funzione della vitamina K. C'è invece un interesse farmacologico a trovare degli inibitori più selettivi che permettano per esempio l'inibizione della trombina o del fattore 10 oppure inibitori del fattore 12, che possono essere usati in condizioni patologiche.

TROMBOEMBOLISMI

Nelle popolazioni dei paesi industrializzati, che si sono spostati dalla giungla alla scrivania, la patologia più importante della coagulazione sanguigna non è una patologia in difetto ma una patologia in eccesso, rappresentata dai tromboembolismi. I **tromboembolismi** sono causa importante di patologia nella popolazione di paesi industrializzati e comportano complicanze importanti, soprattutto perché la patologia tromboembolica va di pari passo con altri tipi di patologia, tipici delle popolazioni sedute alla scrivania, rappresentate da lesioni della parete vascolare, come per esempio l'aterosclerosi. La trombosi è la complicanza più importante dei processi aterosclerotici, che stanno alla base del 50% della mortalità nei paesi industrializzati. Lo studio dei tromboembolismi è diventato molto importante proprio per definire approcci terapeutici che ne diminuiscano l'incidenza.

I trombi possono formarsi in qualsiasi punto del distretto vascolare. Possono formarsi nelle arterie e assumono la caratteristica di **trombo murale o trombo bianco**. *(cfr slide 30)* Questa definizione è relativa al fatto che questi trombi, che si formano sotto flussi sanguigni elevati come quelli caratteristici del flusso arterioso, sono composti esclusivamente da un aggregato piastrinico, che appare appunto bianco e frammezzato da polimeri di fibrina insolubili tipici del coagulo. Questi trombi sono saldamente adesi alla parete arteriosa. Ciò non significa che non possano frammentarsi formando degli emboli, che trascinati dal flusso arterioso possono arrestarsi in qualsiasi punto. Questo punto è determinato esclusivamente dalla localizzazione del trombo primario, a seconda dell'arteria interessata.

Nelle vene i trombi assumono caratteristiche un po' diverse. Vengono chiamati **trombi rossi** perché la riduzione del flusso sanguigno favorisce i processi coagulativi, che tendono ad estendersi dalla sede di formazione del trombo e intrappolano anche i globuli rossi. Questi trombi sono favoriti dal ridotto flusso del distretto venoso e possono raggiungere anche dimensioni estese, di diverse decine di centimetri. I trombi che si formano nelle vene degli arti inferiori risalgono poi fino all'iliaca e alla cava inferiore per diverse decine di centimetri. Anche questi trombi possono frammentarsi. In questo caso la localizzazione degli emboli che si distaccano dal trombo è più facilmente definibile: tutto il circolo venoso aggetta nella vena cava superiore o inferiore, a parte il circolo splancnico che passa attraverso la vena porta prima di arrivare al fegato. Un'importante complicanza dei trombi venosi, infatti, è il passaggio dell'embolo nel cuore destro, attraverso le cave e l'arresto poi nel polmone. L'embolia polmonare è una grave complicanza perché determina l'arresto del flusso attraverso il polmone e causa un'importante conseguenza sul cuore destro. L'embolia polmonare causa una patologia definita **cuore polmonare acuto,** cioè un'insufficienza acuta del cuore destro, dovuta al fatto che il circolo polmonare è in parte ostruito da uno o più emboli.

L'embolo è stato caratterizzato; questa rassegna *(cfr slide 31)* ad esempio mostra che in diverse zone si trovano diverse componenti. Qui per esempio trovate il flusso in una direzione e trovate poi un aggregato piastrinico che si complica con la presenza di altre componenti come fibrina ecc.

Che cosa succede a un trombo? *(cfr slide 32)*

Un trombo può, a seconda delle dimensioni, essere incorporato nella parete del vaso. Questo è successivo a un processo di reendotelizzazione che ricopre la lesione e il coagulo, il quale può essere poi completamente degradato. Nel caso di trombi occludenti, i trombi possono essere ricanalizzati. In questo caso il processo fibrinolitico accoppiato all'adesione delle cellule monocitarie degrada progressivamente la massa trombotica, permettendo una ricostituzione del flusso anche attraverso importanti

coaguli che si possono essere formati nei vasi arteriosi. Qui vedete un'immagine istologica di questi processi di ricanalizzazione. *(cfr slide 33)*

TRIADE DI VIRCHOW ED EZIOPATOGENESI DEI TROMBOEMBOLISMI

Qual è l'eziopatogenesi dei trombi, cioè quali sono i fattori eziologici patogenetici che stanno alla base dei tromboembolismi e che sono stati tanto indagati negli ultimi anni?

In questo campo fa ancora da punto di riferimento un famoso concetto rappresentato dalla triade di Virchow. *(cfr slide 34)* Questa venne suggerita da questo anatomopatologo che lavorò alla fine dell'800 e non aveva strumenti laboratoristici o biochimici particolari, ma intuì alcune cose.

Questa triade è rappresentata da 3 elementi:

1. **Danno endoteliale**
2. **Anomalie del flusso sanguigno**: in particolare fenomeni di stasi, ma anche anomalie rappresentate dalla presenza di lesioni, come classicamente l'aterosclerosi che crea delle turbolenze nel flusso sanguigno, oppure di biforcazioni dei vasi in cui possono crearsi delle situazioni di turbolenza.
3. **Ipercoagulabilità** (allora non si sapeva niente della coagulazione sanguigna ma Virchow intuì che nei soggetti che sviluppavano la trombosi doveva esserci uno stato di ipercoagulabilità, cioè la loro tendenza alla coagulazione del sangue doveva essere maggiore che nei soggetti normali).

Questa triade è ancora utile per interpretare i fenomeni trombo embolici, insieme ad una serie di arricchimenti che poi sono emersi per comprendere questo fenomeno. *(cfr slide 35)*

Partiamo dal danno endoteliale: qualsiasi trombo origina da un danno all'endotelio. Virchow era un anatomopatologo, in quel tempo il lavoro sul cadavere era molto importante in medicina e Virchow poteva facilmente distinguere i coaguli post mortem. Se aprite un vaso di grosso calibro come la cava o l'aorta in un cadavere, potete facilmente scollare tutto il coagulo e rimuoverlo dal vaso perché il coagulo non aderisce a una lesione vascolare. Nel caso del trombo, invece, c'è sempre un punto in cui il coagulo aderisce saldamente e richiede l'esercizio di una forza per strappare il coagulo attaccato alla lesione dell'endotelio. Quindi la lesione dell'endotelio è sicuramente un fattore determinante. È un fattore determinante anche a posteriori con gli occhi attuali, nel senso che esiste una stretta relazione tra una serie di lesioni endoteliali, in particolare nei vasi arteriosi le lesioni aterosclerotiche, e l'aumentato rischio di formazione di un trombo.

Tra gli altri fattori vi è un fattore più intuitivo rappresentato dall'alterazione del flusso sanguigno. Il processo coagulativo vede l'interazione di moltissimi fattori (superficie piastrinica, ecc.) tra di loro e queste interazioni sono favorite da una riduzione del flusso sanguigno. La **stasi**, oltre ad altri fenomeni, è quindi sicuramente uno dei fattori importanti che favorisce il processo coagulativo. La stasi ha conseguenze pratiche, per esempio ormai è abitudine tenere a letto il meno possibile soggetti che hanno subito interventi chirurgici anche di una certa rilevanza proprio per ridurre questo fattore di stasi, che si verifica nei soggetti allettati. La stasi è uno dei fattori che può smascherare altre alterazioni del processo coagulativo, in particolare la ridotta efficacia di meccanismi inibitori: è il famoso fenomeno del trombo successivo a viaggi aerei prolungati. il soggetto va in Brasile o negli Stati Uniti e rimane seduto per 8-10 ore in aereo e quando scende dall'aereo sviluppa una lesione trombotica agli arti inferiori. Questo è una spia di fenomeni che pescano nei processi di alterazione della coagulazione. Le alterazioni a carico dei sistemi inibitori costituiscono un capitolo di più recente sviluppo e il razionale di questo capitolo è rappresentato dal fatto che una riduzione dell'efficacia dei sistemi inibitori della coagulazione sanguigna sposta l'equilibrio verso un eccesso di coagulazione. Quindi a parità di altri fattori, per esempio endoteliali, fenomeni di stasi ecc, le alterazioni dei meccanismi di inibizione della coagulazione sanguigna possono comportare fenomeni di tipo trombo embolico.

Questa tabella *(cfr slide 36)* vi riassume alcuni esempi di alterazioni di sistemi inibitori della coagulazione che possono causare tromboembolismi.

- **Deficienza di proteina C e proteina S**.

Comporta ridotta inattivazione del fattore V e VIII. Queste deficienze possono essere talmente gravi da essere incompatibili con la vita: vi sono dei casi di neonati morti entro poche ore per massiva coagulazione del sangue dovuta a difetti di proteine C e proteine S.

- **Deficienza di antitrombina III.**

L'antitrombina III è un importante inibitore degli zimogeni. Vi sono in questo campo varie interessanti descrizioni: per esempio vi sono descrizioni di mutazioni nel gene che codifica per l'antitrombina III che non risultano in una ridotta sintesi, trascrizione del gene e sintesi della proteina, ma che risultano in una sintesi di una proteina alterata e con una ridotta stabilità. È particolarmente rappresentante il caso di una serie di mutazioni che riducono la stabilità a temperature al di sopra dei 37 gradi. Sono stati identificati alcuni pazienti che presentano mutazioni del gene codificante per l'antitrombina III che sviluppavano tromboembolismi dopo banali processi febbrili in cui la temperatura superava i 38°C-38.5°C, il fattore a quel punto non era più in grado di svolgere il suo ruolo e c'era il rischio di sviluppare queste lesioni.

- **Mutazioni nel gene codificante per il fattore V.**

Queste mutazioni comportano una ridotta associazione tra la proteina C attivata e il fattore V, quindi il fattore V continua ad essere attivato dalla trombina e non viene più inibito dalla proteina C attivata. Questo gruppo di mutazioni ha portato al concetto di APC resistance (resistenza all'azione della proteina C), in cui vengono inquadrati diversi tipi di tromboembolismi ed oggi è una delle prime cose che si va a ricercare.

Vi sono anche modificazioni quantitative. Per esempio vi sono mutazioni che comportano un'aumentata espressione del gene che codifica per la protrombina, quindi un'aumentata sintesi di protrombina. Questo ci dice quanto sia delicato il sistema: anche un eccesso di proteina può far shiftare l'equilibrio verso un eccesso di coagulazione.

(Il professore non si sofferma sulle altre voci della tabella in quanto sono cose a cui ha già accennato, NdR)

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 5/11/2012

Patologia – prof. Berton

Lezione del 05/11/2012

Sbobinatore: Tommaso Ioris

Revisore: Marta Trevisan

(Slide 37)

A proposito dei meccanismi dell'emostasi, enuncerò alcune sottolineature molto generali sul ruolo che l'epitelio ha nella regolazione del processo emostatico.

PROPRIETÁ ANTITROMBOTICHE

L'endotelio integro è una struttura, un organo complesso a funzioni prevalentemente antitrombotiche e alcune di queste funzioni le abbiamo viste nel dettaglio, per esempio l'espressione di **trombomodulina** che funziona da cofattore in grado di inattivare il fattore V e il fattore VIII. **L'eparan-solfato** che costituisce una sorta di glicocalice in cui sono assorbiti gli inibitori degli zimogeni attivati *(registrazione disturbata, credevo il prof volesse intendere ciò, NdR)*.

I successivi 4 meccanismi hanno come bersaglio le piastrine, nel senso che inibiscono la reattività piastrinica, secrete dall'endotelio in condizioni normali.

1-**La prostaciclina (PGI2)** è un derivato dall'acido arachidonico (ve ne parlerò nell'aggregazione piastrinica).

L'ossido di azoto (NO),diffondendo nel sangue, passa nella membrana plasmatica e inibisce alcune funzioni importanti in particolare quelle relative alla polimerizzazione del citoscheletro che sono implicate nell'attività piastrinica.

2-L'endotelio produce enzima, che è un **ADPasi** , espresso sul versante della cellula a contatto col sangue che rimuove un importante attivatore della funzione piastrinica (come vedremo più avanti).

3-L'endotelio rilascia **attivatori del plasminogeno** che partecipa,nella sede in cui si è formato un coagulo, alla degradazione del coagulo formato .

(Non nomina T-PA e Urochinasi, che sono comunque attivatori del plasminogeno, NdR)

In condizioni normali l'endotelio quindi ha diversi meccanismi con cui esercitare le sue funzioni sostanzialmente antitrombotiche.

PROPRIETÁ PROTROMBOTICHE

Questo può essere modificato in certe condizioni, e infatti è importante sottolineare che la superficie endoteliale possa essere convertita in una superficie pro-coagulante. Questo si basa prevalentemente sulla aumentata secrezione del **fattore tissutale e inibizione dell'espressione delle trombomoduline**.

Molte molecole generate nel decorso del processo infiammatorio come citochine,TNF e IL-1 sono potenti induttori dell' espressione del fattore tissutale e invece riducono l'espressione della trombomodulina.

REGOLAZIONE TONO VASALE

L'endotelio svolge inoltre un ruolo importante nella regolazione del tono vasale, quindi nello stato di dilatazione e contrazione delle cellule muscolari liscie perivascolari e quindi regolano sostanzialmente la pressione arteriosa. Vi sono due molecole con funzioni opposte in questo senso, **NO (l'ossido di azoto)** che è una molecola vasodilatatoria e l'**endotelina** che un potente vasocostrittore.

(Slide 38)

NO (ossido di azoto) è derivato da una reazione enzimatica catalizzata da un serie di enzimi che vengono chiamati **NOS (NO sintasi)** e che usano come substrato l'arginina. Il prodotto di questa reazione enzimatica è la formazione di citrullina e di ossido di azoto.

(Slide 39)

Qui si sono dettagli sulla chimica del processo e su alcuni fattori ma li trovate su qualsiasi libro di biochimica.

(Slide 40)

NO SINTASI

NO viene prodotto da tre sistemi enzimatici NOS, che vengono classificati in diverso modo.

La prima NOS venne inizialmente definita **neuronale**, in quanto espressa prevalentemente nel sistema nervoso sia centrale che periferico. È chiamata **nNOS o NOS di tipo 1**, è un enzima che è costitutivamente espresso nelle cellule neuronali e che viene regolato da segnali calcio. Uno dei grandi meccanismi con cui il calcio regola la risposta cellulare, in particolare nel sistema nervoso centrale, è di attivare questa isoforma di NOS. Questa isoforma presenta un dominio che lega la calmodulina che si complessa col calcio, e più domini che legano dei cofattori essenziali per la produzione di NO, ma questa è un problematica strettamente biochimica.

La seconda **NOS, di tipo II, cosiddetta NOS inducibile (iNOS)**, è un enzima calcio dipendente, che però deve la sua definizione di inducibilità al fatto che non è costitutivamente espressa, ma la sua espressione è regolata da una seria di citochine proinfiammatorie (TNF, interferone, IL). L'espressione di questo enzima è classicamente deputabile alla cellula della linea mieloide (monociti macrofagi) attivati da queste citochine. In realtà la sua espressione non è così ristretta nel senso che questo enzima è espresso anche in altri tipi di cellule.

La terza **NOS, di tipo III, detta NOS endoteliale (eNOS),** sostanzialmente ha molte analogie con quella di tipo 1, nel senso che è costitutiva, regolata da segnali calcio, e quindi non viene regolata dalla trascrizione genica, cioè dall'aumentata sintesi dell'enzima ma da risposte acute generate con una serie di agonisti che vedremo poi.

(Slide41)

Quali sono le funzioni principali di questi diversi enzimi?

Qua vi riassumo un problematica molto complessa e ampia che deriva sostanzialmente dallo studio di topi con inattivazione genica delle diverse isoforme di NOS. Questo approccio è stato molto informativo per inquadrare il possibile ruolo fisiopatologico della produzione di NO nel contesto dei diversi tessuti.

nNOS

Quello che è stato osservato è che la produzione a livello del sistema nervoso centrale è importante nell' accoppiamento attività neuronale -flusso cerebrale, per cui neuroni stimolati rilasciano NO anche per favorire il reflusso di sangue, e quindi nutrienti, ai neuroni funzionanti.

Un altro aspetto importante riguarda la produzione di NO a livello del sistema nervoso centrale, implicato in alcuni meccanismi di neurotossicità. NO può avere effetto tossico, quindi un enorme produzione di NO in seguito ad una iper-stimolazione neuronale può favorire il danno neuronale. Questo è importante nel contesto di tutti gli accidenti cerebro vascolari e traumi nel sistema nervoso centrale.

A livello periferico NO si è rilevato un importante regolatore della peristalsi intestinale, favorendo l'alternanza tra rilasciamento e contrazione della muscolatura liscia, sia dello stomaco che dell'intestino. È un vasodilatatore e broncodilatatore.

eNOS

NOS endoteliale è emerso come il classico ETRF (endothelium-derived relaxing factor). La sua scoperta deriva da esperimenti apparentemente semplici ma molto informativi, rappresentati dallo studio dello stato del tono vascolare in segmenti di arteriole isolate. Alcuni autori osservavano che se si rimuoveva l'endotelio da questi vasi isolati si induceva uno stato di contrazione dell'arteriola. Quindi, da questa osservazione derivò il concetto di fattore rilasciante derivato dall'endotelio (che appunto mancava nel caso in cui veniva rimosso l'endotelio dal vado isolato). Questo fattore rilasciato dall'endotelio è poi emerso essere NO, come importante vasodilatatore. Queste osservazioni sono derivate dall'uso di topi con inattivazione genica selettiva del NOS endoteliale. Quest'azione del NO fa in modo che nei topi con inattivazione per il gene che codifica per questa NOS, vi sia un aumento del 30-35% della pressione arteriosa media, una situazione molto simile per esempio a quella di soggetti in condizione di ipertensione.

NO inibisce l'aggregazione piastrinica, ha un'azione inibitoria sull'adesione del leucocita all'endotelio,

Quindi l'endotelio produce fisiologicamente una quantità basale di NO che riduce i processi reattivi basati sia sull'azione piastrinica dei leucociti, ma anche altre funzione più complesse, come quella di favorire la biogenesi dei mitocondri, quindi la moderazione del metabolismo energetico.

iNOS

NOS inducibile è invece quella tipica NOS che originariamente venne descritta nelle cellule delle difese innate e in particolare nella linea mieloide (monociti, macrofagi). Venne identificato rapidamente come un importante fattore microbicida e citotossico, infatti topi con inattivazione genica del NOS, sono molto più suscettibili ad una serie di infezioni di parassiti patogeni a parassitismo intracellulare. Essi possono addirittura venir fagocitati dalla cellule macrofagiche, ma invece di essere uccisi, rimangono all'interno di queste cellule, si moltiplicano e poi determinano una necrosi di questi ospiti impropri, per poi infettare altre cellule. Questo ha messo NOS inducibile nel contesto di un importantissimo fenomeno che è la cosiddetta attivazione del macrofago ,che è un processo di attivazione della cellula macrofagica da parte di linfociti T, prevalentemente CD4+ o helper, che rilasciano una serie di citochine in particolare interferone gamma e TNF che attiva le funzioni microbicide del macrofago. Per esempio, patologie da patogeni a parassitismo intracellulare facoltativo, classicamente l'infezione tubercolare, viene combattuta, ristretta e potenzialmente eliminata proprio nel momento in cui viene stimolata una risposta cellulare T, che comporta il rilascio di citochine che attivano la capacità del macrofago di uccidere il microorganismo. Quest'ultimo ha però meccanismi di resistenza ad azione microbicida dei macrofagi.

NO è implicato quindi nell'azione microbicida e citotossica, ma anche nella modulazione di alcuni aspetti della risposta immunitaria.

Infine, va ricordato che questo NOS inducibile che può essere indotta nelle cellule endoteliali e quindi implicata nei processi di vasodilatazione.

(Slide 42)

REATTIVITÁ DI NO

Per quanto riguarda la reattività di NO, la trovate descritta in qualsiasi testo di biochimica.

NO va incontro a processi di **degradazione ossidativa** interagendo con l'ossigeno. È una molecola ad emivita relativamente breve e attraversa spontaneamente la membrana plasmatica ,in quanto non è polare e di piccole dimensioni, dove svolge la

funzione di regolazione di fenomeni intracellulari. Reagisce però con l'ossigeno formando nitriti e nitrati che sono le molecole più stabili e che consentono indirettamente il dosaggio e la produzione di NO in diversi contesti. Ha alta reattività con il **ferro di emoproteine**, e interagisce col ferro presente in alcuni enzimi, per esempio la guanilato ciclasi, e molte delle sue azioni biologiche sono dovute a questo. È anche in grado di interagire con l'emoglobina, considerata una sorta di tampone di NO che circola nel sangue all'interno del globulo rosso, e trasportato in diversi distretti per regolarne la funzione.

Reagisce anche con **ferro non emico associato ad atomi di zolfo** presente nella catena respiratoria mitocondriale, a questo si deve la sua attività microbicida e citotossica in quanto interferisce con il trasporto degli elettroni e la sintesi di ATP. Lo stesso vale per **la reattività con gruppi tiolici di proteine**.

NO reagisce con un'altra molecole implicata in fenomeni microbicidi e citotossici, cioè **l'anione superossido** formando così perossinitrito, che è un composto altamente reattivo con funzione ossido-riducente che può avere un effetto tossico sia nei meccanismi difensivi sia fenomeni di citotossicità che si accompagnano a processi infiammatori cronici.

(Slide 43)

Qua ci sono altri dettagli che potete vedere a casa.

DOMANDA: *Nel caso della NOS inducibile, NO va a localizzarsi sempre nel torrente circolatorio?*

RISPOSTA: Una parte va nel sangue, una parte diffonde nella membrana basale della cellula endoteliale, interagisce e attraversa la membrana plasmatica della cellula muscolare liscia.

DOMANDA: *Ma gli effetti si sovrappongo fra di loro?*

RISPOSTA: Si sovrappongono nel senso che si sommano, cioè per esempio in una patologia come lo shock emotossico c'è sia una produzione abnorme di citochine, che inducono NOS inducibile nelle cellule endoteliali oltre che nei macrofagi, ma anche la produzione di una serie di sostanze vasoattive che reagiscono con recettori localizzati sotto l'endotelio. Quindi questa abnorme produzione di NO è responsabile della vasodilatazione marcata che si accompagna agli shock settici. Infatti nei topi con knock - out per NOS inducibile c'è un aumentata resistenza, in termini di ridotta mortalità, a modelli di shock settico.

(Slide 44)

Un contesto classico fisiopatologico in cui è implicato l'ossido di azoto, è rappresentato dal fatto che NOS endoteliale è attivata dal calcio e può diffondere nella membrana luminale e interagire con l'emoglobina, ma anche passare rapidamente attraverso la membrana plasmatica della cellula endoteliale e della cellula muscolare liscia, dove si lega alla **guanilato ciclasi**, con i meccanismi che vedremo tra poco, che induce una aumentata formazione di **GMPc** e un fenomeno di rilasciamento muscolare e quindi vasodilatazione. Questa fenomeno appunto succede anche in seguito ad altri stimoli, cioè quelli che inducendo NOS di tipo II nelle cellule endoteliali portano ad una produzione di NO per esempio nel contesto degli shock settici.

(Slide 45)

NO è una di quelle molecole in grado di regolare la trasduzione del segnale all'interno del citosol delle cellule in cui entra. In questo contesto è enfatizzato un ruolo prevalente della guanilato ciclasi solubile che è quella presente nel citosol delle cellule muscolari liscie, ma ci sono anche delle guanilato ciclasi recettoriali. **La guanilato ciclasi converte il GTP in GMPc**.

GMPc ha come bersaglio una serin- treonin chinasi che è la **PKG (protein chinasi G)**, chiamata "G" perché è regolata proprio da GMPc. Questo sistema di attivazione del rilasciamento muscolare è dipendente anche da meccanismi di regolazione dell'emivita del GMPc (ma anche AMPc) convertito GMP da delle **fosfodiesterasi (PDE)** e queste ovviamente spengono la funzione di questa

via. Il famoso Viagra agisce in quanto inibendo le fosfodiesterasi, mantiene elevati livelli di GMPc e quindi questo porta ad un aumento di questi meccanismi che regolano la vasodilatazione mediante rilasciamento della muscolatura liscia perivascolare.

Quali sono i bersagli delle PKG? Tutti una serie di bersagli che modificati attraverso fosforilazione riducono i livelli di calcio intracellulare e quindi spostano l'equilibrio della cellula muscolare liscia verso uno stato di rilasciamento e non di contrazione.

PKG:

-favorisce **l'efflusso di calcio** attraverso la membrana plasmatica,

-blocca o inibisce **questo recettore per IP3**, mediatore intracellulare che determina il rilascio del calcio dagli store intracellulari.

-Agisce **sulla catena leggera della miosina MLC** (ritroveremo questo circuito anche in altri contesti), che soltanto nella forma fosforilata è in grado di interagire con l'actina e di mediare la contrazione actino-miosinica. PKG sposta l'equilibrio verso la forma desfosforilata della catena leggera della miosina attraverso diversi meccanismi. Uno è quello di attivare una **MLC Phoshpatase (Miosin Light Chain Phosphatase)**, che quindi defosforila la catena leggera della miosina spostando l'equilibrio verso la forma defosforilata. Nell' altro meccanismo, PKG fosforila, inattivandola ,una **MLCK (Myiosin Light Chain Kinase)**, cioè una chinasi che fosforila la catena leggera della miosina. Questa chinasi che normalmente sposta l'equilibrio verso la forma fosforilata della catena leggere della miosina e quindi verso la contrazione, quando viene fosforilata dalla PKG si trova in forma inibita e quindi meno attiva.

Al contrario il calcio invece regola la funzione della MLCK in modo positivo. Quindi tutti i meccanismi che portano ad una ridotta liberazione di calcio libero citosolico, riducono l'attivazione della MLCK.

FISIOPATOLOGIA DELLA TRASUZIONE DEL SEGNALE (LEZIONE 6)

(Slide 4)

La trasduzione del segnale è stata innanzitutto razionalizzata con la scoperta di tutta una serie di **RECETTORI DI SUPERFICIE** che, interagendo con un determinato e specifico agonista (che può essere anche chiamato **PRIMO MESSAGGERO**) ,determinano con diversi meccanismi emblematici, mediante una serie di proteine chiamate **PROTEINE ADATTATRICI**,la generazione di un **SECONDO MESSAGGERO** (per esempio classicamente rappresentata da una molecole solubilI nel citosol come il calcio, AMPc ,GMPc), che interagisce a sua volta con un'altra molecola (per esempio un enzima) e ne regola la funzione.

Questo può conseguire quasi all'infinito con una serie di reazioni multiple che caratterizzano questi fenomeni di trasduzione che poi portano ad una specifica risposta biologica.

(Slide 5)

PRIMO CONCETTO BASE SULLA TRASDUZIONE

Nella forma classica, almeno all'inizio, questa trasduzione del segnale viene caratterizzata da una serie di eventi lineari in cui i ligandi interagiscono col recettore e quest' ultimo subisce una modificazione conformazionale che attraverso uno o più effettori determinano una certa azione.

Negli ultimi anni questo quadro è cambiato nettamente, nel senso che la gran parte dei meccanismi di trasduzione del segnale operano attraverso un **meccanismo a rete**. Lo studio di queste reti complesse è l'oggetto di studio della system biology, in cui si cercano di definire delle leggi generali che permettono l'interpretazione di queste reti. Alcune molecole di questa rete compiono delle funzioni fondamentali e sulla base di questi studi sta emergendo chiaramente che alcuni di questi punti sono dei **"nodi critici"**: per cui se voi li inibite collassa completamente la rete di trasduzione del segnale, mentre in altri casi degli inibitori più selettivi di alcune vie particolari non fanno collassare tutta la rete di trasduzione del segnale ma soltanto alcuni aspetti di questa.

(Slide 6)

SECONDO CONCETTO BASE SULLA TRASDUZIONE

Un'altra legge generale sulla trasduzione del segnale comporta il più delle volte una **modificazione post-traduzionale delle proteine**. Vi sono diverse reazioni di cui elenco solo una parte:

-Fosforilazione

-Ubiquitinazione

-Acetilazione

-Poli (ADP)ribosilazione

-Proteolisi

Queste sono quindi implicate in questa catena di eventi e sono classicamente processi post –tradizionali, che avvengono dopo la sintesi della proteina in una particolare cellula e vengono così stimolati a loro volta una serie di processi.

(Slide 7)

Cosa determinano queste modificazioni post-traduzionali covalenti?

-Modificazione conformazionale, che nel caso di un enzima ne condiziona l'accesso al substrato, quindi da questo punto di vista è un meccanismo relativamente semplice.

-Il secondo meccanismo è più complesso, nel senso che una particolare modificazione conformazionale può favorire delle interazioni, per esempio con altre molecole, in particolare con proteine ma non solo.

Nel primo caso, se noi prendiamo una molecola che in condizioni normali ha una conformazione chiusa (e questo succede spesso in biologia) e la modifichiamo, per esempio fosforilata o modificata da una limitata digestione proteolitica, la molecola può aprirsi e quindi può presentare delle interazioni (*dei siti d'interazione, NdR)* che vengono smascherate e così abbiamo, nel caso dell'enzima, l'accesso al dominio enzimatico da parte di un particolare substrato.

Nella seconda modalità questa modificazione conformazionale comporta l'interazione con una specifica molecola, che può essere proteica ma anche lipidica, e genera una serie conseguenze che tratteremo in dettaglio nei singoli casi.

(Slide 8)

MESSAGGERI PRIMARI

- I messaggeri primari sono rappresentati da un’ampia gamma di molecole biologicamente attive che sono in grado di interagire con i diversi bersagli, in particolare nella sede di produzione o a distanza, quindi si tratta di **ormoni, citochine e varie molecole biologicamente attive.**

-Il secondo gruppo (questa è una relativa novità) è rappresentato dal fatto che **molecole adesive** sono implicate nell’interazione cellula-cellula e cellula-proteine della matrice extracellulare e sono in grado di generare segnali. Ne abbiamo vari esempi in contesti patologici.

-Il terzo gruppo di molecole, di cui abbiamo già visto un esempio e ne vedremo almeno un altro paio, sono piccole molecole a breve emivita in grado di attraversare la membrana plasmatica e quindi sono molecole apolari come **NO e ossigeno**.

In alcuni casi, in particolare nel caso del glucosio, regola una serie di fenomeni intracellulari che vedremo, ma mediati dal trasportatore del glucosio che non attraversa di per sé la membrana plasmatica. Anche i radicali dell’ossigeno sono in grado di attivare fenomeni di trasmissione del segnale.

-Infine ci sono anche stimoli meccanici che interessano prevalentemente il distretto vascolare e cardiaco. Questi stimoli agiscono in quanto sottopongono a stress le interazioni delle molecole adesive tra proteina e matrice extracellulare, modulando la loro capacità di trasdurre il segnale.

(Slide 9)

Qua vi lascio una lista di molecole biologicamente attive che vi guarderete a casa.

(Slide 10)

TERZO CONCETTO DI BASE SULLA TRASDUZIONE

Un’altra generalizzazione importante riguarda le **modalità di trasduzione del segnale**, e sono riassumibili fondamentalmente in due meccanismi.

-Dei meccanismi riconoscono molecole idrofiliche che sono esterne alla cellula e che quindi hanno bisogno di specifici recettori o hanno bisogno di trasportatori, come il glucosio, per entrare all’interno della cellula. Questi recettori generano dei secondi messaggeri e tutta una serie di modificazioni covalenti che hanno come bersaglio finale il fattore di trascrizione che regola la trascrizione genica.

-La seconda modalità di cui non parlerò perché riguarda una problematica ad una serie di ormoni: mineralcorticoidi, glucocorticoidi, ormoni sessuali maschili e femminili,che sono tutte molecole lipofiliche che non hanno recettori di superficie e devono attraversare la membrana plasmatica per legarsi direttamente a recettori che sono anche però fattori di trascrizione. Il complesso ormone -recettore migra nel nucleo e regola la trascrizione genica. Su questo c’è un capitolo molto ampio di patologia

che comprende per esempio una nuova classe di recettori nucleari originariamente detti orfani, per i quali si pensava non ci fossero ligandi ma che invece sono stati caratterizzati . Ve ne parleranno in malattie del metabolismo.

(Slide 11)

CANALI

Per quanto riguarda le modalità di trasduzione del segnale da parte dei recettori per molecole idrofiliche che sono all'esterno della cellula, abbiamo i canali regolati da ligandi, cioè canali che si aprono in seguito all'interazione con una particolare ligando, per esempio alcuni recettori per il glutammato, il recettore per l'acetilcolina, il gaba ecc… non ve ne parlerò perché è una problematica correlata alla funzione neuromuscolare e quindi tipicamente fisiologica. Funzionano in modo semplice: la struttura recettoriale è un canale per default e, se si lega il ligando, nel canale passa una determinata specie ionica.

RECETTORI CATALITICI

Gli altri tipi di recettori rientrano in due modalità, ovviamente poi ci sono centinai di molecole diverse.

Sono da una parte i recettori catalitici, recettori che hanno una attività enzimatica. Questi rientrano in due modalità: una intrinseca al recettore, cioè tipi di recettori che hanno nella parte citosolica un dominio ad attività enzimatica e attivato in seguito ad interazione del ligando col recettore. Il recettore è anche un enzima e quindi abbiamo questi enzimi recettoriali.

La seconda modalità è data dal fatto che il recettore di per se non ha un' attività enzimatica intrinseca ma è associato ad una serie di enzimi a cui viene trasmessa una modificazione conformazionale successivamente all'interazione del ligando col recettore. Anche qui vedremo di diversi esempi: i recettori immuni, recettori direttamente o indirettamente associati a molecole enzimatiche che sono importanti nella trasmissione del segnale.

RECETTORI ACCOPPIATI A PROTEINE G

Altro gruppo di recettori sono quelli accoppiati a proteine G trimeriche. Questi recettori hanno una struttura particolare, chiamati anche recettori a serpentina perché attraversano diverse volte la membrana plasmatica con domini idrofobici. Sono accoppiati appunto a proteine G trimeriche costituite da tre subunità (alfa, beta, gamma) e come vedremo questi recettori trasducono il segnale con questa modalità particolare. Il sequenziamento del genoma umano ha chiaramente dimostrato che è la classe dei recettori più rappresentata, ve ne sono almeno 1000 di questo tipo nelle cellule dei mammiferi, ovviamente non espressi tutti sulla stessa cellula. Svolgono moltissime funzioni alcune di queste le vedremo in dettaglio.

(Slide 12)

RECETTORI CATALITICI CON ATTIVITÁ ENZIMATICA INTRINSECA

I recettori catalitici, in particolare quelli che hanno attività enzimatica intrinseca, (nell'immagine vi sono elencati i più classici recettori catalitici) **hanno un dominio con attività tirosin-chinasica**, cioè che fosforilano proteine in residui di tirosina. Vengono anche chiamati tirosin-chinasi recettoriali. Questa classe di recettori è molto importante per molte funzioni e patologie nel contesto della trasmissione del messaggio insulinico.

Vi sono dei recettori che hanno un attività chinasica intrinseca ma **serin-treonin chinasica**, quindi un' attività che fosforila residui di serina e treonina sulle proteine bersaglio. Di questi sono particolarmente caratterizzati i recettori per una particolare citochina che è stata originariamente chiamata trasformig growth factor. È una molecola complessa di cui parlerà Cassatella, implicata nella risposta infiammatoria.

Vi sono poi recettori che hanno un'attività **guanilato ciclasica intrinseca**. Sono recettori per atrial natriuretic peptide, un ormone peptidico atriale che antagonizza fenomeni di accumulo abnorme di sangue nelle cavità cardiaca e atriale, favorendo la natriuresi e l'eliminazione di acqua.

Infine abbiamo recettori che hanno un ruolo antagonista rispetto ai recettori con attività tirosin chinasica, nel senso che sono molecole recettoriali i cui ligandi sono in larga misura non noti e quindi sono recettori orfani, i quali hanno **un'attività tirosin fosfatasica** (defosforilano substrati proteici fosforilati in tirosina).

(Slide 13)

RECETTORI PER FATTORI DI CRESCITA

I recettori con dominio tirosin chinasico o tirosin chinasi recettoriali, sono anche noti come **recettori per fattori di crescita** in quanto sono stati caratterizzati nel contesto del riconoscimento di molecole che hanno funzione di **GF (fattori di crescita)**, cioè favoriscono la crescita di tipi cellulari particolari. Per esempio, il EGF epidermal growth factor costituisce una famiglia di molecole che favoriscono la crescita di cellule epiteliali, il VEGF favorisce la crescita delle cellule endoteliali, ecc.

(Slide 14)

Le caratteristiche di questi recettori prevedono diversi domini eterogenei nella struttura extracellulare, invece all'interno hanno una struttura abbastanza conservata con questo dominio tirosin chinasico che in alcuni casi è duplicato, nel senso che vi sono due domini tirosin chinasici. Questi recettori sono monomerici, espressi singolarmente sulla membrana plasmatica. Un'eccezione è rappresentata dal recettore per l'insulina (che oltre ad essere una molecola importante per il metabolismo è anche un fattore di crescita); questo recettore è di per sé dimerizzato e la sua funzione viene modificata dall'interazione con il ligando.

(Slide 15)

Per quanto riguarda gli altri recettori per i fattori di crescita, un processo fondamentale per la loro attivazione è la **dimerizzazione**: il ligando causa una dimerizzazione del recettore e questo determina quindi una modificazione conformazionale accoppiata ad un avvicinamento di due catene recettoriali. Questo fenomeno determina la trans-fosforilazione, per cui il recettore viene fosforilato in diversi residui di tirosina: è un' **auto-fosforilazione**, costituisce quindi di per se il primo substrato della sua attività enzimatica.

Questa fosforilazione di residui di tirosina innesca uno dei grandi fenomeni emersi nell'ultimo decennio, importanti per la trasduzione del segnale, cioè innesca una serie di interazioni proteina-proteina che ricordano i mattoncini del lego, nel senso che diverse proteine possono incastrarsi una con l'altra.

Questa interazione però è regolata con una certa specificità, nel senso che i residui di tirosina fosforilata sono riconosciute da proteine che hanno particolari domini chiamati **domini SH2** . SH sta per src homology. Src è la prima tirosin chinasi citoplasmatica caratterizzata, il cui gene è stato sequenziato e da questo si è dedotta una struttura proteica che ha portato a una nomenclatura: SH1 SH2 SH3 SH4.

Questi domini SH2 sono appunto emersi come implicati nell'interazione con proteine e si legano a tirosine fosforilate.

(Slide 16)

PROTEINE CON DOMINI SH

Quali sono queste molecole, o almeno le più importanti? Sono una serie di enzimi:

-la fosfolipasi Cg la cui funzione verrà trattata successivamente

-tirosin chinasi citoplasmatiche per esempio **Src** che appunto ha dei domini SH2; in questo caso c'è una sorta di attivazione a cascata di segnali tirosin chinasici,

-fosfatidil inositolo 3- chinasi, che è un particolare e importantissimo enzima di cui vi parlerò in dettaglio. È un lipide-chinasi molto importante nella trasduzione del segnale

- **tirosin fosfatasi**

L'altro gruppo di molecole che ha domini SH2, sono molecole che non hanno attività enzimatica ma che rientrano in quella schematizzazione della trasduzione del segnale che coinvolge degli enzimi e degli adattatori, e quindi rientra nelle molecole adattatrici. Tra questi adattatori vi sono molecole come **Grb2**, **Shc, Nck, IRS** (che sta per insulin receptor subtrate).

Quest' ultima è una molecola che si lega al recettore per l'insulina successivamente all'interazione insulina- recettore e determinante nella trasduzione del segnale insulinico ed è responsabile di una patologia importantissima rappresentata dal diabete di tipo 2 o detto anche impropriamente insulino indipendente.

(Slide 17)

Queste molecole si legano a residui di tirosina specifici, nel senso che non tutti gli SH2 si legano allo stesso residuo di fosfotirosina perché quello che conta è la fosfotirosina in un particolare contesto, in un numero molto limitato di aminoacidi (4-5) che contornano la tirosina fosforilata.

Per esempio se prendiamo questo recettore di tipo GF*(vedi slide, NdR)* , Src si lega ad una certa fosfotirosina, invece il Grb2 si lega a quest'altra fosfotirosina.

Anche questa è un osservazione che potrebbe avere importanti sviluppi in campo farmacologico ma per il momento è solo un osservazione biomolecolare fine ma senza grosse conseguenze pratiche.

(Slide 18)

Le interazioni SH2-fosfotirosina sono interazioni (nell'esempio vediamo questa fosfatasi ma vale anche per altri) che consentono una modificazione conformazionale della molecola e l'acquisizione di una funzione precedentemente celata. Vedete che in questo caso, lo vedremo nel dettaglio parlando di src, di abl, di tirosin chinasi citoplasmatiche importanti nelle neoplasie umane, **SH2 può interagire con fosfotirosine in questa molecola determinando una conformazione estesa**.

La formazione di altre fosfotirosine non fa che competere con queste interazione favorendo quindi questa conformazione estesa e funzionalmente attiva.

(Slide 19)

Questo esempio vi fa vedere i legami degli adattatori, questi possono essere leggermente modificati in altri casi. Se voi prendete il recettore per EGF, esso viene fosforilato in diversi residui in seguito all'interazione col ligando, tra questi residui c'è questa sequenza in cui c'è una tirosina e che viene appunto fosforilata , e che è un ottimo sito di legame per molecole che hanno un dominio **PTB (phosphatase binding domain). È una variante del dominio SH2 che riconosce appunto delle fosfotirosine**. Questa molecola *(quella che contiene il PTB, NdR)* è chiamata **Shc, e possiede anche un dominio SH2 classico**.

Shc viene fosforilata, successivamente al legame, dal recettore in un residuo di tirosina tra PTB e SH2, in una regione di congiunzione tra i due domini.

Questo residuo di tirosina viene riconosciuto da un altro adattatore che è Grb2.

Grb 2 presenta un dominio SH2 che appunto si lega a Shc, ma presenta anche due domini SH3; questi domini riconosco qualcosa di diverso, cioè domini implicati nel riconoscimento di sequenze che presentano diversi residui (in questo caso 2 residui, ma non possono essere molti di più) dell'aminoacido prolina.

Una classica molecola che ha questi residui di prolina è questo **SOS**.

SOS è un GEF (vedremo cosa vuol dire), una molecola che non ha una funzione enzimatica ma una funzione di promozione di scambio tra nucleotidi guanilici e si trova a valle dell'attivazione di questa cascata di molecole , di questi effettori che parte da Ras e poi coinvolge queste altre molecole che vedremo più avanti in dettaglio.

Ras è (anche) un enzima, una molecola chiave nella trasduzione del segnale, e fa parte di una vasta famiglia di proteine che vedremo perché sono implicate nella trasduzione del segnale.

Complessivamente vengono chiamate in due modi: o small gtp binding protein o, per enfatizzare la loro attività enzimatica intrinseca, gtpasi perché come vedremo sono dotate di attività GTPasica.

(Slide20)

REGOLAZIONE SMALL GTP BINDING PROTEIN e GEF

La regolazione di queste **small gtp binding protein** è ben codificata e stereotipata. Qui è illustrata una famiglia di small gtp binding protein, che sono delle **Rho-gtpasi.**

Queste molecole nella forma inattiva sono legate al GDP, alcune di queste sono anche modificate dall'attacco di un lipide complesso che ne permette l'ancoraggio sulla faccia interna della membrana plasmatica. Nelle forma legata al GDP, Rho è appunto in forma inattiva. Esse vengono attivate da questi **GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factor)**: sono molecole non enzimatiche, ma una volta attivate (come vedremo ci sono diverse vie di attivazione di questi GEF) interagiscono con le small gtp binding protein e ne determinano una modificazione conformazionale che comporta il distacco del GDP.

L'affinità per GDP cala drammaticamente una decina di volte. Siccome il GTP è dieci volte più concentrato nel citosol rispetto al GDP, per la legge di azione di massa esso viene sostituito dal GTP. Nella forma legata al GTP, le small gtp binding protein si attivano.

Cosa vuol dire che si attivano? Modificano la loro conformazione e possono interagire con una serie di effettori. Questi effettori sono diversi tipi di molecole tra cui vi sono per esempio determinati enzimi. Il legame all'enzima può modificarne l'attività, attivandolo diverse volte.

Un aspetto centrale nella regolazione della funzione di queste small gtp binding protein è che la loro azione è intrinsecamente ed anche estrinsecamente finemente regolata, nel senso che queste molecole sono anche enzimi , cioè hanno anche un'azione GTPasica e quindi dopo un certo tempo, che può esser più o meno lungo a seconda del microambiente e di altri fattori, la small gtp binding protein utilizza la sua attività GTPasica per idrolizzare il GTP a GDP e quindi ritorna nello stato inattivo. Questa attività GTPasica è estrinsecamente regolata. È regolata da queste molecole chiamate **GAP (GtPase activating protein)**, proteine che attivano l'attività GTPasica intrinseca della small gtp binding protein, e quindi favoriscono l'idrolisi del GTP e il ritorno allo stato di riposo.

Le mutazioni dei geni che codificano per le small gtp binding protein possono dare un eccesso di funzione: vi sono tutte una serie di mutazioni che caratterizzano Ras che comportano per esempio ridotta attività GTPasica e quindi, riducendosi l'attività GTPasica, l'equilibrio viene spostato verso un maggiore attività e capacità di agire sugli effettori.

Al contrario vi sono nel campo delle neoplasie umane delle delezioni di geni per GAP, che modificano l'attività di gap, che comportano una ridotta stimolazione dell'attività GTPasica e quindi lo spostamento dell'equilibrio verso la forma attiva del small gtp binding protein.

(Slide 21)

STRUTTURA MOLECOLARE DI RAS-GTP

Qui vediamo la struttura molecolare del RAS-GTP.

Switch1 e Switch2 sono sequenze aminoacidiche, in particolari regioni della molecola che , quando Ras è legato al GDP, sono nascoste all'interno della molecola. Il legame col GTP ne determina la loro esteriorizzazione, per cui queste regioni sono quelle implicate nell'interazione con una serie di effettori. Quindi c'è questa modificazione conformazionale indotta dal legame del GTP rispetto al GDP, che fa in modo che possa o non possa interagire col suo effettore e modificarne la funzione.

(Slide22)

EFFETTORI DI RAS

Quali sono gli effettori di Ras?

Gli effettori di Ras più caratterizzati sono questi quattro che vedete nella diapositiva, ci fermeremo con qualche dettaglio su alcuni di questi.

Uno è rappresentato da **Raf**, che è una serin-treonin chinasi, che sta a monte della cascata delle cosiddette MAP-chinasi.

Il secondo enzima è un isoforma particolare di **fosfolipasi C**. Queste sono in realtà fosfolipasi che agiscono selettivamente sui fosfoinositidi, importanti per la generazione di segnali del calcio.

Ras-gtp interagisce anche con l'enzima **fosfatidil inositolo 3- chinasi (PI3K)**, che è ancorato alla faccia interna della membrana plasmatica, nel senso che si lega alla coda citoplasmatica dei recettori per i fattori di crescita.

(Slide 23)

ATTIVAZIONE DI RAS

Ras viene attivata in diversi modi.

Viene attivata attraverso la sequenza che vi ho fatto vedere prima (cioè ShcàGrb2àSOSà Ras) oppure in alternativa c'è anche questa sequenza abbreviata che non comporta l'intermediazione di Shc, ma comporta direttamente il legame di Grb2 al recettore per il fattore di crescita.

Questo fenomeno può essere sostituito in altre vie di trasduzione del segnale, che vedremo, in cui sono implicate delle tirosin chinasi citoplasmatiche, in particolare

-FAK-P (Focal Adhesion Kinase) che può legare Grb2 e quindi attivare Ras,

-IRS-P (Insulin Receptor Substrate) che lega Grb2 e quindi attivare Ras ,

-LAT-P (Linker for Activation of T cell) che è un adattatore importante nella trasduzione del segnale nei linfociti T in seguito al riconoscimento dell'antigene; può legare Grb2 e attivare Ras.

Quindi c'è un classica via attivazione di Ras che avviene attraverso processi di fosforilazione di tirosina che coinvolgono recettori per fattori di crescita (tirosin chinasi recettoriali) ma anche tirosin chinasi citoplasmatiche e adattatori.

(Slide 24)

Mentre questo modulo di attivazione di Ras coinvolge come GEF fondamentale SOS, vi sono altri GEF che vengono attivati attraverso altri meccanismi, in particolare GEF che vengono attivati attraverso quelli che sono segnali classici rappresentati da un **aumento del calcio citosolico o l'attivazione di una protein chinasi C** , che vengono attivati nel contesto della stimolazione della cellula da parte di recettori che non hanno a che fare con le tirosin chinasi recettoriali (cioè recettori per fattori di crescita).

Quindi l'attivazione di Ras è un fenomeno diffuso nell'ambito della trasduzione del segnale e si può arrivare all'attivazione di Ras nella forma legata al GTP attraverso diverse strade.

MAP-CHINASI

La sequenza di eventi a valle di Ras (una delle sequenze di eventi) è la cascata delle **MAP- chinasi** che coinvolge l'interazione di Ras con **MAPKKK**, che è una serin- treonin chinasi, che fosforila **MEK1 e MEK2**. Queste ultime sono **MAPKK**, chinasi complesse perché hanno la doppia specificità di subtrato, nel senso che fosforilano sia residui di serina- treonina che di tirosina.

Abbiamo infine il bersaglio finale, le **MAPK : ERK1 e ERK2**, che sono serin-treonin chinasi e hanno come bersaglio tutta una serie di fattori di trascrizione che collegano quindi la trasduzione del segnale di recettori fra di loro molto diversi con la trascrizione genica.

Questi fattori di trascrizione fosforilati migrano nel nucleo e dettano la trascrizione di una serie di geni che sono implicati, per esempio nel caso del Ras, nella proliferazione e sopravvivenza cellulare e che quindi sono importanti meccanismi di patologia della proliferazione cellulare, in particolare la trasformazione neoplastica.

(Slide 25)

Questo è un modulo di tre famiglie di chinasi che si attivano a cascata per evocare una risposta biologica; coinvolge anche due MAPK, **p38** e **JNK**, che sono importanti nell'attivazione delle cellule delle difese immuni sia innate che adattative, e che vengono attivate attraverso diversi stimoli come per esempio certe citochine e recettori per patogeni.

Esse sono implicate nella effettuazione di moltissime funzioni tra cui la regolazione della trascrizione di geni responsabili dello sviluppo di processi infiammatori.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 6/11/2012

FISIOPATOLOGIA DELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE (continuazione)

In riferimento alla slide 25 della lezione 6: MAPK signaling cascades

La cascata delle chinasi porta alla fosforilazione di fattori di trascrizione che vanno nel nucleo a permettere la trascrizione di specifici geni. Vi sono:

- un capitolo relativo alle difese biologiche, alla produzione di citochine, all'infiammazione e ai processi rigenerativi e riparativi;

- un capitolo specifico per il Ras e la sua cascata di chinasi importante nell'ambito delle neoplasie.

Tre geni codificano per *tre diverse isoforme* di Ras espresse in diversi modi nei diversi tessuti.

Mutazioni nel Ras sono importanti nel processo di **formazione neoplastica**: sono tutte mutazioni che alterano direttamente o indirettamente l'attività GTPasica → inibizione del processo di spegnimento, critico nella regolazione negativa del Ras.

Altra componente del rapporto tra la cascata delle MAP chinasi attivata da Ras e la patologia: riguarda la scoperta, relativamente recente (risale a un paio di anni fa) di rare **sindromi** chiamate **neuro-cardio-facciali-cutanee NCFC** o **cardio-facciali-cutanee CFC**. Sono caratterizzate da diverse combinazioni di anomalie facciali, difetti cardiaci, bassa statura e ritardo mentale. Vengono classificate in diverse isoforme e tutte queste patologie sono dovute ad alterazioni della via Ras – Raf – MEK – ERK. La causa può essere una mutazione nel gene per la *neurofibrimina*, che è una Ras GAP. Altre volte vi sono mutazioni proprio in Ras, direttamente o nella fosfatasi SHP2 che regola Ras. Anche mutazioni in Raf o MEK1/2 provocano queste patologie.

Questa via regola dunque importanti aspetti della differenziazione e della proliferazione cellulare → mutazioni nei geni codificanti per componenti di questa via di trasduzione del segnale possono alterare lo sviluppo con queste complesse patologie.

SHP2

Tra le varie proteine enzimatiche che si legano ai recettori per i fattori di crescita, come appena accennato, c'è anche una **fosfatasi**: **SHP2**.

Si potrebbe pensare, per default, che la fosfatasi spenga i segnali; in realtà le fosfatasi possono anche attivare la trasduzione del segnale: è proprio quello che fa la SHP2, una tirosin fosfatasi citoplasmatica non recettoriale.

Può infatti **attivare Ras** in diversi modi:

1) può *legarsi al recettore* del fattore di crescita, da cui viene fosforilata, e mediare il legame Grb2-Sos-Ras;

2) può *defosforilare molecole inibitorie* che si associano col Grb2 → liberazione del dominio SH2 di Grb2 che a quel punto può legarsi alla fosfotirosina del recettore del fattore di crescita;

3) può *modulare l'attività* di una Ras GAP =GTPase activating proteins, che inibisce la funzione di Ras; la fosfatasi *defosforilando le Ras GAP* ne favorisce il distacco dal microambiente in cui avviene l'attivazione di Ras e altre molecole, cioè la faccia interna della membrana plasmatica → favorisce l'attivazione della via Ras.

INTERAZIONI PROTEINA-PROTEINA

Vi sono 4 modalità principali di **interazioni proteina-proteina**.

1) Il sito di riconoscimento di una proteina è rappresentato da una **corta sequenza amminoacidica**:

Alcuni esempi:

- il *dominio SH3* che riconosce sequenze ricche di prolina (Pro-x-x-Pro)
- il *dominio WW* che riconosce sequenze di prolina in cui è presente anche una tirosina (Pro-Pro-x-Tyr).

2) Il sito di riconoscimento è un **singolo amminoacido**, appartenente ad una corta sequenza amminoacidica**,** che viene **modificato covalentemente.**

E' il caso di:

- *SH2* e *PTB* che riconoscono le fosfotirosine;
- il gruppo di *proteine* chiamate *14-3-3*, che lega invece fosfoserine e funziona da "molo" che trattiene nel citosol delle proteine che vengono fosforilate impedendo loro di raggiungere il bersaglio intracellulare su cui funzionano. Le 14-3-3 possono svolgere funzioni inibitorie.

3) Il sito di riconoscimento è un **componente LIPIDICA della membrana plasmatica**:

vi sono proteine che interagiscono con lipidi della faccia interna della membrana plasmatica. Ad esempio:

- il *dominio C1* di alcune proteine riconosce il diacilglicerolo,
- il *C2* la fosfatidilserina e l'acido fosfatidico

- *domini PH* e *PX* i fosfoinositidi fosforilati in posizione 3.

4) Il sito di riconoscimento è **uguale a quello di interazione**:

questo vale per il *Death Domain (DD)*, il *dominio CARD* e il *PYD*.

NB: CARD e PYD sono importanti nell'assemblaggio dell'inflammosoma.

Come detto in precedenza, i recettori per fattori di crescita fosforilati **trasducono il segnale** con due modalità:

1) legano degli *adattatori* → Grb2 e Shc → si va verso l'attivazione di Ras

2) legano degli *enzimi:* interazione di per sé attivante → legame SH2-Src porta ad un cambio conformazionale di Src che viene attivato. In altri casi il recettore del fattore di crescita fosforila alcune molecole attivandole → ciò vale per PLCγ e la tirosin fosfatasi SHP1/2.

Centrale nella trasduzione del segnale in diversi tipi di cellule è la fosfatidil inositolo 3-chinasi (PI3K), che affronteremo ora in dettaglio.

FOSFATIDIL INOSITOLO 3-CHINASI (PI3K)

La fosfatidil inositolo 3-chinasi è costituita da **due subunità**:

- una subunità catalitica
- una subunità regolatrice, che può essere diversa → si parla di **3 isoforme** della PI3K: la α, la β e la δ.

Queste molecole sono attivate attraverso due fondamentali meccanismi, uno dei quali è rappresentato dall'interazione con le fosfotirosine del recettore del fattore di crescita dimerizzato. Quest'interazione è mediata non dalla subunità catalitica, che è la p110, ma dalla subunità regolatrice, di cui esistono diverse isoforme, la più rappresentata delle quali è la p85 (il numero sta per il peso molecolare) che ha due domini SH2 che interagiscono con le fosfotirosine. Di per sé la p85 è anche fosforilata dal recettore per il fattore di crescita, il che le trasmette un cambio conformazionale che attiva probabilmente l'enzima.

In questo disegno (*cfr. slide 4, LEZ7) si enfatizza la localizzazione di un enzima a contatto o in vicinanza del suo substrato. La PI3K è citosolica: un'aliquota di quest'enzima si lega al recettore per il fattore di crescita → può agire sul suo **substrato**, cioè il **fosfatidil inositolo 4,5-bisfosfato PIP$_2$**, che viene convertito in fosfatidil inositolo 3-fosfato PIP$_3$.

Nella slide 5 della LEZ7 possiamo osservare la struttura di questa classe di fosfolipidi: i **fosfoinositidi**. Come tutti i fosfolipidi, i fosfoinositidi sono costituiti da un alcol, il glicerolo, che ha tre atomi di carbonio a cui sono legati tre gruppi idrossilici. C1 e C2 legano due acidi grassi, il C3 lega una molecola polare. (il fosfolipide è una molecola anfotera che funziona proprio perchè ha una testa polare che interagisce con l'acqua). I fosfoinositidi rappresentano una percentuale ridotta dei fosfolipidi sulla faccia interna anche se si trovano sulla faccia esterna (attorno al 10%). Nel loro caso il gruppo idrossilico è legato all'inositolo, che è uno zucchero a sei atomi di carbonio. L'inositolo è legato attraverso un atomo di fosforo nella posizione 1. Viene poi fosforilato in

posizione 4 e 5 → si ottiene il PIP_2, fosfatidil inositolo 4,5-.bisfosfato. Questa classe di fosfolipidi è molto importante nella trasduzione del segnale, a vari livelli.

Il fosfatidil inositolo 4,5-.bisfosfato viene fosforilato da questa lipide chinasi, la PI3K, in posizione 3 → si viene a costituire il fosfatidil inositolo 3,4,5-trisfosfato che a sua volta può essere modificato (fosforilato in diverse posizioni).

Ci sono isoforme di PI3K che fosforilano non usano il PIP_2 come substrato ma il fosfatidilniositolo esclusivamente in posizione 3. Queste molecole potrebbero essere implicate in un efficace meccanismo di autofagia.

La fosforilazione in posizione 3 della PI3K può essere **modificata**. Lipide fosfatasi importanti sono:

- **SHIP-1** che defosforila in posizione 5 formando un'altra molecola, il fosfatidil inositolo 3,4-bisfosfato;

- **PTEN** che reversibilizza la formazione del PIP_3 → defosforila in posizione 3 e riforma il PIP_2.

PTEN e SHIP-1 sono inibitori dei segnali generati dal PIP_3 :

- PTEN perché riforma PIP_2;
- il fosfatidilinositolo 3,4-bisfosfato è comunque una molecola che non lega proteine che hanno domini particolari efficacemente come il PIP_3→ anche SHIP-1 inibisce.

Vi sono **due principali vie di attivazione della fosfatidil inositolo 3-chinasi**, che utilizzano i due grandi sistemi recettoriali anticipati:

- **recettori dei fattori di crescita** con dominio tirosinchinasico intrinseco attivano le forme α, β e δ

- **recettori accoppiati a proteine G** trimeriche attivano invece un'altra isoforma della PI3K detta isoforma γ.

Questa terminologia (α, β, δ, e γ) si riferisce a *differenze* nelle strutture delle *subunità catalitiche*. Le subunità catalitiche *si associano con subunità regolatrici diverse.*

Esiste anche un meccanismo diretto delle fosfatidil inositolo 3-chinasi che avviene tramite Ras, che può interagire con la subunità catalitica della fosfatidil inositolo 3-chinasi → attivazione. Nel caso dei recettori dei fattori di crescita si hanno segnali che si **amplificano.**

-

STRUTTURA DELLE FOSFATIDIL INOSITOLO 3-CHINASI E CLASSIFICAZIONE

CLASSE I:

La subunità catalitica γ non ha il p85-binding domain che è implicato nell'interazione con le proteine regolatrici p85, p55 ecc. che mediano l'interazione tra le fosfatidil inositolo 3-chinasi e le fosfotirosine del recettore o di altre molecole completamente diverse. Invece la p110γ interagisce con un'altra molecola adattatrice che viene chiamata p101.

CLASSE II e III:

La funzione di queste classi nei mammiferi è meno nota. La classe III può essere implicata in meccanismi di regolazione dell'autofagia.

Qual è il meccanismo con cui il PIP_3 innesca una serie di eventi citoplasmatici che portano alla trasduzione del segnale?

TRASDUZIONE DEL SEGNALE DA PARTE DEL FOSFATIDIL INOSITOLO 3-FOSFATO

Il meccanismo è basato sul fatto che il PIP_3 è un fosfolipide la cui componente polisaccaridica, cioè l'inositolo, che viene fosforilato in posizione 3, 4 e 5 , viene riconosciuto da delle proteine citosoliche. Vi sono delle proteine con un particolare dominio noto come **dominio PH** (dominio di omologia della plextrina, prima proteina in cui venne identificato) che lega il PIP_3 → vengono ridistribuite dal citosol alla membrana; questa è un'interazione che determina delle modificazioni conformazionali in alcune di queste proteine che le attivano (in particolare nel caso degli enzimi).

Vi sono 4 classi di proteine ben caratterizzate con dominio PH che vengono attivate dal PIP_3:

- **GEFs**, (fattori di scambio del nucleotide guanosina) che agiscono sulle "small" GTP binding proteins;
- **AKT e PDK** entrambe fosforilano in Ser/Tre le proteine e agiscono in concerto;
- **famiglia Tec**, espressa prevalentemente in cellule ematopoietiche, che fosforila in tirosina le proteine.

In questa lezione → attenzione al gene per AKT, che è un master gene che regola importanti aspetti del metabolismo cellulare (proliferazione, sopravvivenza, metabolismo, ecc.)

La gran parte dei **GEFs** cioè dei fattori che attivano le small GTP binding proteins → specifici. Tutti hanno domino PH, ma anche domini che conferiscono specificità all'attivazione attraverso altre vie: es. p115RhoGEF ha un dominio che lega una subunità α particolare, α12/13 che è una subunità α appartenente alle proteine G trimeriche. Per quanto riguarda Ras ci sono dei GEF che presentano dei domini che consentono l'attivazione da parte di calcio-calmodulina → segnali classici sono in grado di attivare questo GEF per Ras → vi sono molteplici vie di attivazione di Ras.

La famiglia **Tec**, di tirosin chinasi, introduce alla struttura generale delle tirosin chinasi citoplasmatiche. Queste proteine hanno domini SH (Src homology) , ma anche, all'N-ter, un dominio specifico detto TH (Tec homology) che è un dominio PH. Questa famiglia viene attivata in seguito al legame con il PIP_3, e in seguito ad eventi aggiuntivi es. ulteriore evento di fosforilazione.

AKT

L'AKT è un master gene nella regolazione di moltissime risposte cellulari.La proteina è una serin/treonin chinasi, un enzima che per esser attivato ha bisogno di due eventi:

1) della formazione del PIP_3;

2) di due eventi di fosforilazione che sono mediati da una serie di chinasi in parte caratterizzate e da PDK1 che agisce insieme all'AKT nel senso che la fosforila.

Lo spegnimento di questo segnale dipende da una serie di eventi:

- la reversibilizzazione della formazione del PIP_3, cioè la riconversione nel PIP_2 mediata ad es da PTEN;

- dall'altra vi sono una serie di fosfatasi citoplasmatiche che possono defosforilare AKT e riconvertirla nella forma inattiva conformazionalmente chiusa che si osserva in condizioni di riposo.

Come agisce l'AKT (o PKB)? → secondo modalità generali, che si possono osservare nella slide 12 della LEZ7.

1) L'AKT attivata **fosforila** una **molecola inibitrice** e ciò ne reversibilizza la funzione (si disattiva l'inibizione) → es. nel caso di molecole che inibiscono il ciclo cellulare e la trascrizione genica.

2) L'AKT può **fosforila**re un **attivatore** che viene disattivato → es. proteine che regolano il processo apoptotico, se fosforilate spostano l'equilibrio verso la sopravvivenza della cellula.

3) L'AKT può infine **fosforila**re un **attivatore/inibitore** inattivo, attivandolo. Questo meccanismo di inibizione basato su eventi di fosforilazione è spesso accoppiato (non sempre) all'interazione dell'attivatore/inibitore fosforilato con le proteine 14-3-3. La fosforilazione del substrato da parte di AKT in serina o treonina determina l'ancoraggio di un sito delle proteine 14-3-3.

AKT interviene in diverse funzioni:

1. Innanzitutto **attiva**, in modo indiretto attraverso una via che passa per l'inibizione di un inibitore, un complesso proteico chiamato mTORC1, molto importante nella regolazione della **sintesi proteica** e del **ciclo cellulare**.
2. In secondo luogo → inibendo FOXO e Bad AKT **inibisce i processi apoptotici** → sposta l'equilibrio verso la sopravvivenza, e fa entrare la cellula in ciclo cioè favorisce la proliferazione cellulare.
3. Terzo livello molto importante e di recente caratterizzazione → AKT è considerato un importante **regolatore del metabolismo** e in particolare del metabolismo del glucosio.

Un evento tipicamente regolato dall'AKT è <u>l'**APOPTOSI**.</u>

L'apoptosi si differenzia dalla necrosi in quanto non assistiamo alla lisi della membrana plasmatica e al rilascio di costituenti che inducono una risposta reattiva come processo infiammatorio. L'apoptosi comporta la formazione di corpi apoptotici che racchiudono organelli e frammenti nucleari modificati e che vengono poi rimossi. Le cellule che vanno incontro ad apoptosi mostrano dei blebs, bolle sulla membrana plasmatica della cellula che si raggrinza (sono corpi apoptotici in via di formazione). Caratterizza il processo apoptotico una profonda disorganizzazione del sistema mitocondriale che normalmente forma strutture tubulari, mentre in questo caso vengono frammentati.

Le tappe classiche dell'apoptosi prevedono uno **stimolo**, che determina un **segnale intracellulare**, seguito da una **fase effettrice** che porta all'**apoptosi** segnata infine dalla **rimozione dei corpi apoptotici**.

Vi sono **due meccanismi di induzione dell'apoptosi**:

1) uno è dipendente dai cosiddetti “recettori di morte”.(Via estrinseca)

2) l'altro è indipendente da questo fenomeno ed è mediato da modificazioni che si verificano nei mitocondri.(Via intrinseca)

In entrambi i casi si ha l'attivazione di enzimi citosolici che degradano una serie di proteine implicate nel processo e portano allo sviluppo dell'apoptosi.

Non c'è una così netta separazione tra la via estrinseca, stimolata dai recettori di morte che legano TNF e Fas Ligand, e la via intrinseca regolata da altri fenomeni. Ad es. BID attivata dalla via estrinseca favorisce la formazione di canali sulla membrana esterna del mitocondrio che fanno uscire una serie di molecole che attivano la fase effettrice, esattamente come le proteine della via intrinseca.

Esiste in realtà una **terza via** che viene chiamata **Granzyme B pathway**: si basa sul fatto che alcune cellule del sistema immunitario (linfociti T citotossici e cellule NK) quando interagiscono col loro bersaglio cellulare, secernono delle **perforine** che formano un canale sulla membrana attraverso cui entra il granzima B che attiva BID o opera direttamente sulla caspasi 3.

AKT ha il ruolo di regolare tutta una serie di proteine che sono implicate nelle alterazioni di permeabilità.

Le proteine che regolano l'apoptosi a livello mitocondriale appartengono a una grande famiglia originariamente definita **famiglia Bcl2** (da B cell lymphoma). Queste proteine vengono classificate in due gruppi:

1) alcune hanno **funzione prosopravvivenza** → inibiscono il processo apoptotico.

Il capostipite è **Bcl2**: queste proteine hanno domini specifici compreso un dominio transmembranario per la localizzazione sulla membrana esterna dei mitocondri.

2) Altre hanno **funzione proapoptotica** → sono responsabili della formazione di pori che determinano l'uscita di una serie di molecole.

Comprendono la **famiglia Bax** (Bax, Bak) e la **famiglia BH3-only** di cui vi sono diversi membri (una citosolica es. Bid e altre con dominio transmembranario).

Queste proteine si possono anche distinguere in base al fenomeno cosiddetto di **MOMP**: mitochondrial outer membrane permebilization:

- la famiglia Bcl2 blocca il processo di permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale,
- nel caso delle proteine con funzione proapoptotica è la famiglia Bax ad essere effettrice di MOMP (si assembla a formare pori);
- la famiglia BH3-only attivano la Bax family o inibiscono la Bcl2 family → spostano l'equilibrio verso il processo apoptotico.

Come fanno queste molecole a regolare l'apoptosi? Facendo uscire dal mitocondrio diverse molecole:

- **citocromo c** posto nello spazio tra membrana mitocondriale interna ed esterna; va a complessarsi con **Apaf** costituendo l'**apoptosoma**, il quale interagisce poi con la procaspasi 9 attivandola; il bersaglio della caspasi 9 sono altre procaspasi;

- **Diablo/smac** → inibitore di un inibitore dell'apoptosi;

- **AIF: apoptosis inducing factor**;

- **Endonucleasi G** → cliva gli acidi nucleici a livello nucleare.

Come fa l'AKT a inibire l'apoptosi?

Vi sono diversi meccanismi:

1) uno ad esempio basato sulla fosforilazione di **Bad**: la Bad fosforilata viene sequestrata nel citoplasma legata a proteine 14-3-3;

2) in un altro caso AKT fosforila **FOXO**: FOXO fosforilato viene inibito. Normalmente regola la trascrizione di fattori proapoptotici (Bim, Fas ligando);

3) altro meccanismo importante è la fosforilazione della proteina **MDM2** che nella forma fosforilata migra nel nucleo e determina la degradazione della p53 nel proteasoma, dopo il legame di questa con l'ubiquitina. La p53 è una proteina in grado di favorire il processo apoptotico in quanto regola la trascrizione di Noxa e Puma e interagisce con Bcl2.

Un secondo fondamentale bersaglio di AKT è rappresentato dal complesso **mTORC1**, inizialmente caratterizzato come un complesso fondamentale per la regolazione della sintesi proteica ma che regola anche geni importanti per la crescita cellulare. L'AKT fa parte delle serin/treonin chinasi che comprendono ERK, la MAP chinasi attivata da Ras, e un substrato di ERK, RSK → queste tre fosforilano i bersagli TSC1 e TSC2. Anche in questo contesto → convergenza tra l'azione di Ras e l'azione di AKT a valle del PIP_3. La fosforilazione di TSC1 e TSC2 è un evento di inibizione e comporta il fatto che si riduce l'inibizione di Rheb che è un attivatore di mTOR; mTOR è una serin/treonin chinasi che forma il complesso mTORC1 con Raptor. TSC1 è anche chiamata amartina, TSC2 è detta anche tuberina; sono due proteine scoperte parecchi anni fa senza sapere l'esatta funzione biologica. Hanno permesso di caratterizzare una serie di neoplasie a distribuzione famigliare che erano definite come “sclerosi tuberosa”: in questa sindrome compaiono tumori benigni detti amartomi in diversi organi quali rene, polmone, cervello e cute. Mutazioni loss of function spostano l'equilibrio verso un'eccessiva attivazione del mTORC1. TSC1 e TSC2 sono delle GAP (GTPase activating proteins) con azione inibitoria su una small GTP binding protein: Rheb, che nella forma legata al GTP può interagire con mTOR. In realtà vi sono eventi di fosforilazione mediati da una chinasi, AMP chinasi: fosforila TSC1 e TSC2 determinando un'attivazione delle GAPs → via di inibizione che spegne i segnali mTOR-dipendenti.

Questa via è considerata importante in molti contesti. Questa via venne caratterizzata nel contesto della reazione di una cellula a degli stress metabolici rappresentati da una deprivazione di nutrienti. Una cellula che riceve poco glucosio, poco ossigeno e pochi amminoacidi deve mettere in atto una serie di meccanismi che minimizzino i suoi consumi energetici: uno di questi è basato sullo spegnimento di processi endosintetici come la sintesi proteica.

NB: in circa il 40% dei tumori colon-rettali sono state identificate mutazioni della via della PI3K. Vi sono anche mutazioni di Ras.

PI3K E I SUOI DOWNSTREAM TARGET REGOLANO NEGATIVAMENTE L'AUTOFAGIA

L'autofagia è implicata in diversi processi patologici ad es. a livello del SNC e in modo però non chiaro nelle neoplasie. Gioca un ruolo anche nell'invecchiamento.

PDK → AKT → Rheb → mTOR inibiscono l'autofagia.

Relazione tra riduzione apporto calorico e longevità → un eccesso di nutrienti attivando la via di mTOR regolerebbe l'invecchiamento.

PI3K E REGOLAZIONE DEL METABOLISMO

La PI3K è implicata nella regolazione del metabolismo perchè **aumenta il trasporto di glucosio.**

Nel caso delle cellule neoplastiche o nei tessuti in attiva proliferazione si è rivalutato un **effetto** osservato da **Warburg**, che viene anche definito **glicolisi aerobica** perchè definisce una condizione in cui – indipendentemente dalla presenza o meno di ossigeno – la cellula utilizza preferibilmente la via glicolitica.

Interesse sul rapporto alterazioni metaboliche – crescita neoplastica.

Cellule neoplastiche esprimono GLUT1, trasportatore del glucosio, e non solo; La PI3K induce l'espressione di GLUT4 → elevato trasporto di glucosio.

Iperattivazione via glicolitica → nella via vi sono side chains che portano alla sintesi nucleotidi/lipidi/amminoacidi → cellula in attiva proliferazione sfrutta il glucosio non per formare ATP ma altre molecole importanti per una cellula che cresce e si divide. Questi enzimi sono studiati per creare farmaci che li blocchino in cellule iperproliferanti.

L'aumentato trasporto di glucosio da parte delle cellule tumorali viene utilizzato per visualizzarle mediante fluorodesossiglucosio radioattivo mediante "positron emission tomography" **(PET).** Il desossiglucosio entra tramite i trasportatori del glucosio ma non viene metabolizzato e rimane confinato nel citosol. Cellule neoplastiche ne internalizzano grosse quantità e ciò ne consente la localizzazione.

NB: Il fluorodesossiglucosio è eliminato attraverso l'emuntorio renale → i reni, la vescica e l'uretra risultano sempre positivi anche quando non c'è patologia!! Facendo la PET il cervello è nero perchè le cellule del SNC hanno un sistema non saturabile del trasporto del glucosio → intensa radioattività.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 7/11/2012

Lezione di Patologia,

Professor Berton, 07 novembre 2012

Francesca Ligorio

La patologia dei recettori dei fattori di crescita.

L'esempio più classico riguarda l'identificazione di una serie di mutazioni, per esempio con guadagno di funzione, dei recettori per i fattori di crescita, come il recettore per EGF, tipo ckit, come il recettore per FGF (fibroblastic growth factor).

Questi recettori con mutazioni che comportano guadagno di funzione ovviamente per default shiftano verso una costante, maggiore e prolungata trasduzione del segnale, infatti sono state identificate queste mutazioni: nel caso dell EGF receptor nel carcinoma a piccole cellule del polmone, nel caso di ckit in tumori gastro intestinali, melanomi e leucemie mieloidi.

Questa eccessiva trasduzione del segnale da parte di recettori mutati in neoplasie umane ha stimolato la ricerca di farmaci inibitori.

Questo è un campo molto in espansione quindi vi sono anche cose nuove; questa qui invece è una cosa molto più classica che ormai ha la sua età.

Le strategie che sono state usate sono di due tipi:

1. Uso di anticorpi diretti contro il recettore; questo approccio si usa prevalentemente nel tumore della mammella.

1. L'altro approccio, derivato dalla strada aperta dalla scoperta di inibitori di tirosin-chinasi, è considerato curativo nella maggior parte dei casi di leucemia mielode cronica; appunto in seguito alla strada aperta da questo farmaco inibitore di tirosin chinasi sono stati e si stanno tuttora caratterizzando una serie di molecole in grado di inibire direttamente l'attività chinasica del recettore e quindi spegnere il segnale.

Questo è un campo estremamente importante oggi nell'oncologia; si cerca di selezionare dei farmaci che non siano citotossici come sono i tradizionali chemioterapici, che hanno effetti collaterali molto grossi, ma si cerca di identificare dei farmaci che inibiscano, per esempio, specifiche vie di trasduzione del segnale. In particolare sono importanti queste vie regolate da attività tirosin chinasica.

Per quanto riguarda gli anticorpi come questo trastuzumab, usato nel carcinoma della mammella, essi possono agire attraverso diversi meccanismi. Infatti ce ne sono di diversi di questi anticorpi, e hanno diverse conseguenze.

Una, classica è data dal fatto che essi sono in grado di inibire il processo di dimerizzazione che, come vi dicevo, è essenziale nella trasduzione del segnale del recettore. Quindi qualsiasi interferenza nella dimerizzazione blocca l'effetto della trasduzione del segnale. C'è da dire che nel caso di alcune mutazioni i recettori mutati trasducono il segnale anche senza dimezzarsi, quindi in questo caso l'efficacia dell'anticorpo è ridotta.

Questi anticorpi si possono anche usare per favorire fenomeni di citotossicità che sfruttano cellule di tipo NK o i linfociti citotossici, che riconoscendo l'anticorpo possono uccidere il bersaglio.

Oppure, legando all'anticorpo stesso delle molecole inibitorie, queste vengono inviate direttamente alla cellula.

Nell'ambito della trasduzione del segnale di questi recettori vale la pena di soffermarsi su un recettore che fa parte di questo gruppo però è particolarmente implicato nella regolazione del metabolismo**: il recettore dell'insulina**.

Questo è un tetrametro, costituito da due catene alfa e due beta. Le catene beta hanno una corta sequenza extracellulare e invece una lunga sequenza citoplasmatica che contiene il dominio tirosin chinassimo. Le catene alfa invece sono legate covalentemente alle catene beta, sono extracellulari, e sono implicate nell'interazione col ligando, l'insulina.

Il legame con l'insulina trasmette la modificazione conformazionale che attiva l'attività chinasica del dominio intracellulare. Vi è l'autofosforilazione del recettore in diversi residui di tirosina e quest'autofosforilazione in modo classico, analogo agli altri recettori dei fattori di crescita, regola la trasduzione del segnale a valle.

Il recettore per l'insulina è in grado di mediare diversi eventi metabolici rilevantissimi, in particolare l'uptake di glucosio (prevalentemente nel muscolo scheletrico ma anche in altri distretti, per esempio il tessuto adiposo, mentre il trasporto di glucosio in altri tessuti, come il sistema nervosa centrale non è regolato. Anche nel fegato non è molto regolato dall'insulina).

In moltissimi tessuti, sia fegato che muscolo scheletrico, promuove la glicogeno sintesi a partire dal glucosio; l'insulina è un ormone che favorisce lo storage di molecole energetiche in attesa del digiuno.

Blocca invece la gluconeogenesi, prevalentemente a livello epatico, dove avviene la maggiore neosintesi di glucosio a partire da altre molecole

Attiva i processi di lipogenesi, inibendo al tempo stesso i processi di lipolisi; questo si verifica prevalentemente nel tessuto adiposo.

C’è poi tutta una serie di funzioni aggiuntive che rientrano in questo favorire l'utilizzo di nutrienti; per esempio aumenta l'uptake di alcuni aminoacidi, favorisce l'espressone genica. Questi sono fenomeni più classici nel contesto di trasduzione del segnale da parte di recettori per fattori di crescita.

Le alterazioni della funzione dell’ insulina rappresentano ormai un'epidemia, questa (immagine 3, lezione 8) è una vecchia diapositiva che dà il senso di come si continui a calcolare un aumento dei casi di diabete su scala mondiale, per il 90% rappresentato dal diabete "dell'adulto" (termine improprio), diabete insulino indipendente (anche questo termine è improprio, lo chiamiamo semplicemente di tipo II). Queste forme di diabete sono in crescita non solo nei paesi "opulenti" ma anche nei paesi in via di sviluppo. Rappresenta una sorta di epidemia su scala planetaria e quindi è molto studiato dal punto di vista dei meccanismi e sopratutto dalla possibile utilizzazione di approcci terapeutici.

Le forme di diabete si riassumono in due gruppi:

1. il primo dovuto a difetti di secrezione da parte delle cellule beta pancreatiche di insulina, il tipico **diabete insulino-dipendente**, cioè che si corregge somministrando insulina; è quel diabete tradizionalmente chiamato “diabete giovanile”, perché compariva in età prepubere o subito dopo la pubertà ed è dovuto ad un meccanismo autoimmunitario di distruzione delle cellule beta pancreatiche. Questo diabete è detto di **tipo I**, quel diabete che è indipendente dalle problematiche rappresentate dall’iperalimentazione dall’infiammazione ecc. E’ un diabete in cui il meccanismo patogenetico è rappresentato da una patologia autoimmunitaria che porta all'eliminazione delle cellule beta pancreatiche che secernono insulina.

2. la seconda forma di diabete è riassunta con un gruppo di difetti di azione di insulina a livello periferico. E’ quello che veniva tradizionalmente chiamato "**diabete insulino indipendente**", in quanto i soggetti, che si presentavano con marcata iperglicemia, non erano però ipoinsulinemici, anzi queste forme di diabete, che nella maggior parte dei casi sono accompagnati da obesità, vanno in parallelo con uno stato transitorio di iperinsulinemismo (cioè maggiore quantità di insulina circolante). E’ il diabete che compariva in età adulta quindi veniva anche chiamato non “diabete giovanile”, ma “diabete dell'adulto”; è un diabete oggi chiamato di **tipo II**. E’ rappresentato da un gruppo eterogeneo di alterazioni, che innanzitutto sono dovute a diversi gradi di resistenza a ll'insulina e in secondo luogo (per quello la distinzione tra diabete insulino-indipendente e dipendente è ormai non più molto corretta) esita inevitabilmente in una situazione di diminuita secrezione di insulina.

Questa caratteristica del diabete di tipo II è emersa nel momento in cui gli approcci terapeutici hanno prolungato moltissimo la vita dei soggetti diabetici.

L'elemento centrale che sta alla base di queste forme di diabete (che sono la stragrande maggioranza, più del 90% dei diabeti che si osservano), è oggi riassunto in questo termine**: "resistenza" all'insulina**.

Questo vuol dire una ridotta capacità dell’insulina, indipendentemente dalla sua quantità, di trasdurre una serie di segnali che sono essenziali per la risposta della cellula all'insulina. Come se la cellula ricevesse una minor quantità di insulina, o non fosse in grado di "sentirla". E’ interessante notare che quando diversi anni fa emerse la problematica dei recettori di membrana, quindi

l'importanza dei recettori nel riconoscere molecole esterne, tutta la ricerca si concentrò nel dimostrare che in alcune situazioni fisiopatologiche particolari, come l'obesità, si sviluppava una diminuita espressione del recettore per l'insulina. Questa diminuita espressione veniva letta nel contesto di quei meccanismi a cui vi ho accennato, che sono classici in biologia cellulare, rappresentati dalla downregulation, cioè una ridotta espressione di un recettore se questo viene iperstimolato.

La relazione tra obesità e iperinsulinismo poteva sfociare in una diminuita espressione del recettore per l'insulina; in realtà la storia, approfondendo le ricerche, si è rivelata più complicata, nel senso che la diminuzione del recettore per l'insulina non spiega assolutamente la ridotta risposta all'insulina. E' quindi emerso questo concetto di resistenza all'insulina, che pesca nelle conoscenze, poi emerse, dei meccanismi di trasduzione del segnale insulinico.

Questa tabella (immagine 5) è interessante per vedere alcune differenze tra diabete I e diabete II.

Quest'altra tabella (immagine 6) invece descrive molto bene alcuni aspetti centrali del diabete di tipo II.

Il diabete di tipo II origina per un incrocio (da questo punto di vista rientra nelle patologie multifattoriali classiche) tra una serie di alterazioni genetiche (che includono alcuni tipi di obesità, la capacità delle cellule beta pancreatiche di secernere insulina, la resistenza all'insulina, quindi tutta una serie di alterazioni su cui mi fermerò in dettaglio sulla capacità del segnale di trasdurre all'interno della cellula e altri fattori poco chiari; alcuni di questi sono anche condizionati da fattori ambientali) che si incrociano con i classici fattori ambientali, rappresentati dalle abitudini di vita della popolazione dei paesi industrializzati (quali attività fisica, iperalimentazione, ecc).

Questa situazione porta per un periodo più o meno lungo (anche decenni) in cui l'insulino-resistenza, cioè la ridotta risposta all'insulina, si somma con l'iperinsulinemia.

Sta a significare che le cellule beta pancreatiche (come abbiamo visto parlando di particolari alterazioni, per esempio del recettore per lo sulfonilurea o del canale per il potassio) secernono insulina in modo direttamente proporzionale ai livelli di glucosio, perché più glucosio c'è nel sangue, più glucosio entra nella cellula beta pancreatica (visto che il trasposto di glucosio in queste cellule non è saturabile ed è dovuto a trasportatori che sono costitutivamente espressi), e Il glucosio che entra nella cellula beta pancreatica viene utilizzato per la sintesi di ATP.

Q Più ATP si sintetizza più aumenta il rapporto ATP/ADP, e più si chiude il canale K+ e quindi viene secreta insulina.

In una situazione" fisiologica" compensata abbiamo un'aumentata produzione di insulina proprio in risposta all'iperglicemia.

Questo fenomeno porta però ad alterazione delle cellule beta pancreatiche; questa modificazioni sono dal punto di vista molecolare solo in parte comprese. Esitano in questa ultima tappa, cioè quella del diabete di tipo II,presente nel soggetto anziano che viene da una storia di iperglicemia molto prolungata in cui si ha una riduzione del numero (ipoplasia) delle cellule beta pancreatiche con fenomeni sì di riduzione del numero ma anche di alterazioni funzionali.

Quindi una riduzione di produzione di insulina (ipoinsulinemia), lo sviluppo di fenomeni glucocitotossici (capitolo a cui accennerò soltanto perché è abbastanza complesso) e tutto questo complesso di fenomeni caratterizza il classico diabete tipo II.

Diabete su cui si tenta di intervenire, a seconda delle fasi di sviluppo, in diversi modi. Inizialmente con tutta una serie di farmaci che miglirano la risposta all'insulina; poi nella fase di ipoinsulinemia bisogna per forza ricorrere all'insulina.

Quindi questa insulino-resistenza comporta un diminunito uptake di glucosio in risposta all'insulina nel muscolo scheletrico, una diminuita inibizione della sintesi di glucosio a livello epatico, una diminuita inibizone della lipolisi a livello del tessuto adipiso e quindi a un accumulo di lipidi.

Un breve flashback su una problematica ancora aperta, questa tabella (immagine 7) vi fa vedere una serie di meccanismi che possono essere responsabili della fase finale, cioè quella della alterazione delle cellule beta pancreatiche.

Sono diversi:

1. la glucotossicità di per sé: l'elevato livello di glucosio nelle cellule beta pancreatiche può alterare in vari modi diverse vie metaboliche.

1. Il fenomeno di lipotossicità: la ridotta risposta all'insulina porta a un rilascio di acidi grassi che possono determinare danni in diversi tessuti

3. un importante aspetto è lo stress ossidativo: l'aumento dell'utilizzo di glucosio nella catena respiratoria mitocondriale aumenta la produzione di derivati tossici dell'ossigeno (perchè più funziona la catena respiratoria mitocondriale, maggiore è il linkage di elettroni che riducono l'ossigeno, formando superossido che danneggia le membrane biologiche ecc ecc). In questo contesto va anche sottolineato che si sta affrontando questa questione della relazione tra danno mitocondriale e patologia della cellula beta panceatica proprio nel contesto dell'autofagia. Uno degli aspetti dell'autogfagia è la mitofagia, cioè la degradazione di mitocondri invecchiati e meno funzionanti in cui il linkage di elettroni durante il trasporto nella catena mitocondriale aumenta.

I danni che possono essere indotti da glucotossicità e lipotossicità potrebbero ripercuotersi in un'inibizione dei processi autofagici e mitofagici e quindi nell'accumulo di mitocondri meno efficienti nel sintetizzare ATP, e che invece rilasciano elettroni nel microambiente riducendo l'ossigeno.

4. L'altro aspetto è rappresentato dal distress del reticolo endoplasmico: questo aumento della produzione di insulina, che è sintetizzata e accumulata nel comparto vescicolare all'interno delle cellule beta pancreatiche (e quindi fa un viaggio attraverso il reticolo endoplasmico e il Golgi), può determinare una sorta di stress del reticolo endoplasmico, che innesca dei meccanismi tesi a riparare questo stress, con neosintesi di fosfolipidi, neosintesi di chaperoni ecc ecc. Però questo stress può anche comportare aumentata produzione di citochine proinfiammatorie, direttamente o indirettamente responsabili di una serie di fenomeni che vedremo successivamente.

5. Infine quello che è stato apprezzato è che osservando le isole beta pancreatiche di soggetti con diabete tipo II si osserva elevata incidenza di deposizione di amiloide nel contesto di queste strutture. Questo deposito di amiloide è di incerta origine; potrebbe favorire dei danni meccanici, tossici, diretti sulle cellule beta pancreatiche.

Come vedete ci sono molti motivi per cui una prolungata iperglicemia e una ridotta risposta all'insulina possono portare ad una ipoinsulinemia dovuta al danno alle cellule beta pancreatiche.

La resistenza all'insulina è stata riletta negli ultimi anni partendo dalle informazioni che si stanno accumulando sulla trasduzone del segnale da parte dei recettori per i fattori di crescita, cioè in generale le tirosin chinasi recettoriali, in particolare del recettore per'insulina.

Vi sono anche in questo caso due vie principali che sono importanti nel segnale insulinico:

1. la via delle MAPK e quindi l'attivazione, successivamente alla fosforilazione del recettore e al legame di IRS al recettore (si ha) il legame del modulo tra due SOS (?) ed anche di questa SHP2(), che potenzia l'attività di Ras.

2.L'altra via è quella della PI3K, classe 1A, cioè quelle accoppiate alla subunità p85, che assieme a PDK1 fosforilano e attivano AKT. Come vedremo AKT è un master gene nella trasduzione del segnale insulinico e rende conto di molte delle risposte all'insulina classiche, quelle che vi ho riassunto prima.

Una particolarità della trasduzione del segnale insulinico nel contesto della trasduzone del segnale da parte delle tirosin chinasi recettoriali è dovuta al fatto che tra il recettore e l'attivazione di questi due sistemi di adattatori (Grb2 e Sos) o di enzimi (PI3K) c'è come intermezzo questa molecola, IRS.

IRS (insuline receptor substrate), di cui esistono tra l'altro diverse isoforme, è un nodo centrale nella trasduzone del segnale insulinico ed è da un certo punto di vista considerato attualmente la molecola principale che giustifica la resistenza all'insulina.

L'IRS ha una struttura molto particolare ed è composto da un dominio PH, partendo dall'Nterminale, da un dominio PTB e poi da una lunga sequenza aminoacidica che contiene diversi residui di tirosina o di serina.

L'IRS si lega al recettore insulinico forforilato in tirosina mediante il dominio PTB (che è un dominio SH2 modificato, phosphotyrosine binding domain, con un sito di riconoscimento di fosfotirosina). Il legame è poi stabilizzato dal fatto che la formazione del PIP3 favorisce l'interazione del dominio PH con il PIP3 che si sta formando sulla faccia interna della membrana plasmatica.

Sulle tirosine fosforilate in questa specie di molo molecolare a cui si legano diverse componenti si conosce molto, si sa cosa lega cosa. PI3K si può legare mediante il dominio p85 a queste due fosforosine o a questa, Grb2 si lega a questa fosfotirosina, SHP2, che è un regolatore delll'attivazione di Ras (?), si lega a queste fosfotirosine.

Vedete poi che ci sono moltissimi residui di serina che vengono fosforilati da diverse serin treonin chinasi, tra cui rientrano AKT e chinasi attivate durante le risposte infiammatorie dalle cellule della linea melodie, ma anche linfoide, come IKK e JNK.

Vi sono delle proteinchinasi C, e alcune sue isoforme; vi sono anche, ancora una volta analogamente ad AKT, chinasi che sono attivate dallo stesso recettore, come ERK che è a valle di Ras o mTOR che è a valle di AKT.

Quindi quest'osservazione suggerirebbe che esiste anche un meccanismo di (incomprensiblie).

La cosa che vi anticipo su cui tornerò è rappresentata dal fatto che si può semplificare il significato dei fenomeni di fosforilazione in tirosina e serina di IRS, dicendo che tutti gli eventi di fosforilazione in tirosina sono eventi essenziali per la trasduzione del segnale insulnico perché attivano vie downstram come la via della PI3kinase, Grb2, Sos, Ras, mentre è emerso negli ultimi anni il concetto che la fosforilazione in serina riduce gli eventi di fosforilazione in tirosina, quindi da un certo punto di vista inibisce o spegne il segnale insulinico.

Questo è stato un passo in avanti fondamentale nella comprensione dello stato di resistenza all'insulina e sopratutto di un rapporto molto stretto, emerso nel corso degli anni, tra infiammazione e resistenza all'insulina.

Alcune chinasi come IKK, JNK, PKC vengono attivate a valle di processi di tipo infiammatorio, e questi processi infiammatori prolungati, che si verificano in particolari situazioni patologiche, hanno un ruolo importante nell'inibire la trasduzione del segnale insulinico.

Questa è un'osservazione che poi ha permesso di riapprezzare vecchissimi lavori dei primi decenni del secolo scorso che segnalavano che in malattie infettive infiammatorie croniche (tipicamente nei soggetti con tubercolosi, ad esempio) si sviluppava progressivamente anche il diabete. Cosa che non era facilmente interpretabile e che oggi si può interpretare in questo contesto.

Un aspetto rilevante di questa relazione tra infiammazione e inibizione del segnale insulinico attraverso l'inibizone della fosforilazione in tirosina di IRS dovuta a quest'eccesso di fosforilazione in serina è rappresentata dal fatto che l'associazione più frequente che c'è nel diabete di tipo II è con l'obesità.

Nel contesto di questa osservazione sono esplosi negli ultimi 5 o 6 anni moltissimi studi che collegano l'obesità a una sorta di stato infiammatorio prolungato che ha come conseguenza questa eccessiva fosforilazione di IRS in residui di serina e quindi inibizione del segnale insulinico.

Vediamo alcuni aspetti della trasduzione del segnale insulinico che è analogo a quello dei recettore dei fattore di crescita e in particolare, nel caso della PI3K, comporta a un certo punto la attivazione dei AKT, in particolare nell'isoforma AKT2. AKT è un master gene nella trasduzione del segnale insulinico perché regola questi quattro processi:

1.Regola un aumentato uptake di glucosio nelle cellule in cui questo avviene in modo regolato come nel muscolo scheletrico e nel tessuto adiposo.

2. Regola la sintesi di glicogeno, l'utilizzo del glucosio quindi come riserva energetiche che serve poi nelle fasi di digiuno

3. Inibisce la gluconeogenesi a livello epatico

4. aumenta la sintesi proteica sfruttando la trasduzione del segnale che avviene sul complesso mTor.

L'uptake di glucosio è dovuto a una serie di segnali che portano alla traslocazione di trasportatori per il glucosio, in particolare GLUT4. GLUT4 è il trasportatore dipendente dal segnale insulinico, nel senso che è localizzato in vescicole intracellulari e l'attivazione diAKT porta alla traslocazione di queste vescicole sulla membrana plasmatica; si ha quindi un aumentata espressione del trasportatore e un aumentato uptake di glucosio.

Questo si vede bene in questa immagine (immagine 12) di una cellula in cui si è marcato con un anticorpo fluorescente il GLUT4. In condizioni basali è in un grosso comparto intracellulare vescicolare (che con questa tecnica fluorescente non può essere apprezzato in dettaglio, ma si tratta di vescicole presenti all'interno della cellula). Se voi stimolate con l'insulina, la fluorescenza si distribuisce in gran parte sulla superficie della cellula, sulla membrana plasmatica. Questa trasclocazione è fondamentale per l'aumento del trasporto di glucosio.

A regolare queti venti provvede uno dei meccanismi classici di azione dell'AKT, cioè l'inibizone di un inibitore. Si tratta di un small GTP-binding-protein, della famiglia Rab; le Rab sono circa 15 proteine small GTP-binding-protein che regolano il traffico vescicolare, che avviene tra reticolo endoplasmico e Golgi e tra Golgi e membrana. Queste Rab sono, come tutte le small GTP-binding-protein, inibite da GAP (GTPase activating protein). La s160 è una GAP per Rab; l'AKT fosforila e inibisce, probabilmente sequestrandola in un comparto diverso, la GAP. Quindi sposta l'equilibrio verso una maggiore funzione delle Rab, quindi verso la traslocazione.

Il secondo evento rilevante è la sintesi di glicogeno che avviene a livello muscolare e epatico.

In questo contesto c'è da ricordare che se se si prende in considerazione la glicogeno sintesi, cioè l'accumulo di glucosio sotto forma di glicogeno, e la glicogeno lisi, cioè il processo opposto, vi sono delle regolazioni, ormonali e dovute ad altri mediatori

intracellulari che esercitano un'azione opposta su queste due vie. I processi di glicogeno lisi sono attivati da eventi di fosforilazione, e invece gli enzimi che regolano la gliocgeno sintesi sono inibiti da eventi di fosforilazione.

Questo meccanismo è un po' più chiara se andiamo a precisare alcune cose: la glicogeno lisi, cioè la formazione di glucosio 1-fosfato a partire dal glicogeno, è favorita dalla fosforilazione della glicogeno fosforilasi, che è meno attiva (*defosforilata, ndr*). Il glucagone, per esempio, aumenta il cAMP che attiva PKA che fosforila la glicogeno fosforilasi defosforilata, convertendola nella forma A, attiva, che quindi favorisce la degrdazione del glicogeno.

Nel caso della glicogeno sintesi il meccanismo è un po' più complesso: la fosforilazione converte la glicogeno sintasi in un enzima meno attivo. Questa fosforilazione è sostenuta da un enzima, la glicogeno sintasi chinasi (di cui esistono diverse isoforme), che fosforila la glicogeno sintasi attiva in un forma meno attiva; questo enzima, la glicogeno sintasi chinasi è bersaglio dell'AKT.

AKT inibisce glicogeno sintasi chinasi, spostando l'equilibrio verso la forma defosforilata di glicogeno sintasi che quindi favorisce la sintesi di glicogeno.

Alcune fosfatasi, come la PP1 (protein fosfatasi 1) regolano in modo coordinato questi fenomeni, nel senso che PP1 favorisce la glicogeno sintesi perché defosforila la glicogeno sintasi e inibisce invece la glicogeno lisi perché defosforila la glicogeno fosforilasi fosforilata.

Questi fenomeni di fosforilazione della glicogeno sintasi che ne comportano l'inibizione non sono mediata solo da GSK3 (glicogeno sintasi chinasi), ma la glicogeno sintasi è bersaglio di diverse chinasi che la inattivano e che agiscono in modo coordinato.

La glicogeno sintasi può essere fosforilata da PKA, da chinasi calcio-dipendenti che la fosforilano costitutivamente; può essere fosforilata anche da AMPK e questo è uno dei meccanismi con cui interviene questo enzima, che è attivato nelle condizioni di deprivazione di substrati nutritivi, quali ossigeno, glucosio, aminoacidi. AMPK interviene favorendo la degradazione e spostando l'equilibrio verso la glicogeno lisi in quanto inibisce la glicogeno sintasi.

GSK3 è quella fosforilata e inibita dall'insulina mediante AKT/PKB.

Il terzo fenomeno importante nella trasduzione del segnale insulinico è l'inibizione della gluconeogenesi; è molto complessa e passa mediante due meccanismi di inibizione diretta di una serie di enzimi importanti nella gluconeogenesi, oppure la regolazione della trascrizione di questi enzimi a livello nucleare. Non entriamo in eccessivi dettagli.

L'ultimo fenomeno è quello dell'attivazione del complesso mTOR e l'aumento della sintesi proteica. Ci ritorno perchè nel contesto del fatto che il recettore del fattore di crescita attraverso Ras, Src, Rsk o attraverso AKT attivano mTor e la sintesi proteica, va segnalata un'importante via inibitoria a cui avevo soltanto accennato.

Questa è costituita da AMPKinasi. AMPK è un enzima che fosforila in serina TSC2; questa fosforilazione non è però inibente, ma attivante.

Quindi la conseguenza è un'attivazione della funzione GAP di questa proteina e quindi un’inibizione maggiore di Reb e una mancata attivazione di mTor e del suo complesso. Questo ha come conseguenza una ridotta sintesi proteica. Questo evento ha un

significato nel contesto di un cellula che, deprivata o nutrita insufficientemente in seguito a basse dosi di glucosio, ossigeno e anche aminoacidi deve innescare dei processi di risparmio di energia e trovare tutte le forme possibili per produrne.

Uno dei meccanismi di risparmio di energia è per esempio la soppressione della sintesi proteica; un altro meccanismo (già visto) per produrre più energia è l'AMPK che inibisce la glicogeno sintasi, spostando l'equilibrio verso ulteriore degradazione di glicogeno e quindi la liberazione di glucosio.

L'AMPK inibisce la sintesi proteica, inibisce la glicogeno sintesi e inibisce processi liposintetici e di sintesi del colesterolo, che sono energicamente impegnativi e in generale riduce le reazioni che consumano ATP e cerca di aumentare quelle che portano a sintesi di ATP.

Una di queste è la glicogeno lisi, l'altra è l'aumentata espressione di GLUT4 e del trasporto del glucosio.

Questo è uno dei motivi importanti per cui questa chinasi è il bersaglio di uno dei farmaci più usati nel diabete di tipo II, la Metformina.

La Metformina è un attivatore, attraverso l'attivazione di LKB1, di AMPK e nonostante AMPK abbia alcune funzioni opposte a quelle dell'insulina (inibisce la glicogeno sintesi, favorisce la lipolisi) il bilancio della sua azione è molto importante nel correggere il segnale insulinico, in particolare in relazione ad aumentata espressione del GLUT4.

Quindi questo aumento del trasporto di glucosio anche in una situazione di bassa trasduzione del segnale insulinico è molto importante nell'azione farmacologica della Metformina.

Questa via viene attivata inoltre dal regolare esercizio fisico, da alcuni ormoni che regolano il metabolismo lipidico e da certi altri farmaci che sono in sperimentazione e si spera possano essere più efficienti e avere effetti collaterali minori rispetto alla Metformina.

L'ultima cosa su AMPK: l'AMPK è considerata poter svolgere un ruolo importante nel diabete di tipo II non soltanto per l'effetto che ha sull'aumentato trasporto di glucosio, ma in quanto regola positivamente fenomeni di autofagia, mitofagia e biogenesi dei mitocondri che possono incidere su quel progressivo esaurimento della funzione delle cellule beta pancreatiche che accompagna il diabete di tipo II.

Da questo punto di vista emerge quella problematica rappresentata dal fatto che se si mettono in relazione vie di trasduzione del segnale stimolate da un eccesso di calorie rispetto a vie stimolate dal digiuno, si vede che l'eccesso di introduzione di calorie stimola tutta una serie di vie (insulina, recettore per l'insulina, AKT, mTor ecc..) che sono implicate in un precoce invecchiamento cellulare, mentre la restrizione calorica, attraverso AMPK e tutta una serie di altri processi, può favorire un rallentamento dell'invecchiamento. Questo è anche il versante metabolico e di trasduzione del segnale che viene studiato nel contesto di processi di invecchiamento della cellula.

Torniamo di nuovo alla resistenza all'insulina. Come vi anticipavo la resistenza all'insulina viene oggi interpretata nel contesto di uno spostamento dell'equilibrio verso una maggior fosforilazione in serina di IRS con conseguente riduzione della fosforilazione in tirosina. Quindi a parità di ligando, cioè di ormone extracellulare, la risposta della cellula sarà ridotta. Questa cosa è stata più studiata nel contesto della relazione tra obesità e aumentata resistenza all'insulina, in base al fatto che la relazione tra obesità e diabete di tipo II è estremamente importante.

Questa storia si può riassumere in questo modo: vi sono oggi parecchie osservazioni che concordano nel dire che l'ipertrofia del tessuto adiposo comporta uno stato di sofferenza del tessuto adiposo stesso che innesca un processo di tipo infiammatorio chiamato adiposite; la conseguenza di questo processo infiammatorio è il rilascio di una serie di citochine, quali TNFa e IL-1b che agiscono sia in locus sull'adipocita, sia a distanza cioè nel muscolo scheletrico e nel fegato.

Queste citochine sono in grado, riconosciute da specifici recettori che vanno anche attraverso vie diverse, di attivare due chinasi importanti, JNK e IKK, che sono due tra le chinasi che fosdorilano IRS e inibiscono la trasduzione del segnale insulinico e successivamente inducono una serie di alterazioni a livello delle cellule beta pancreatiche. Questa problematica dell'adiposite è veramente esplosa raggiungendo livelli quasi eccessivi.

Quali sono i meccanismi che correlano obesità, iperglicemia e infiammazione?

1. Il primo è determinato dall'Adiposite.

Accumulando sempre più lipidi gli adipociti vanno in uno stato di sofferenza e, con un meccanismo solo in parte chiarito, rilasciano chemochine e citochine che, alterando l'endotelio vascolare del tessuto adipose, determinano un reclutamento di monociti. Monociti che, con una classica risposta di tipo infiammatorio, rilasciano citochine che inibiscono il segnale insulinico sia in loco che a distanza.

Questa cosa è stata dimostrata con moltissimi approcci: per esempio l'inattivazione genica di una serie di molecole implicate nel reclutamento di monociti. Ad esempio in Topi knockout per ligandi come il CCL2, che è una chemochina che agisce selettivamente sulle cellule monocitarie, o il knockout per il recettore del CCL2 risultano in una aumentata sensibilità all'azione dell'insulina, quindi un ritardo dello sviluppo di diabete tipo II in topi che sono comunque obesi. In questo caso è stato quindi possibile dissociare l'obesità dallo sviluppo di insulino resistenza e quindi diabete di tipo II.

Qui (immagine 28) vedete la differenza tra tessuto adiposo magro e un tessuto adiposo che cresce di dimensioni, in questo caso si ha non tanto aumento di numero delle cellule ma aumento di dimensioni; si ha la classica ipertrofia (caratterizzata dall'accumulo di un prodotto, non da aumentata sintesi proteica) e vedete che aumenta la quantità di cellule infiammatorie, in particolare monociti, nel tessuto adiposo stesso.

Una domanda importante che è stata posta fin dall'inizio di questi studi che correlavano l'aumento della massa adiposa col processo infiammatorio, era: "cos'è che stimola le cellule infiammatorie reclutate, i monociti, a produrre una maggiore quantità di citochine?"

La prima risposta è data da un lavoro, molto importante (poi in realtà un po' ridimensionato), che evidenziava un fenomeno rilevante: un classico recettore per PAMPs, un pattern recognition receptor (PPR) (cioè un recettore per componenti superficiali dei patogeni) in realtà era anche un recettore che riconosceva acidi grassi rilasciati dal tessuto adipose. Questo recettore, TLR4, genera una via di trasduzione del segnale che attiva tra l'altro IKK e JNK nelle cellule monocitarie e porta ad aumentata produzione di citochine.

Questa è stata un'osservazione molto importante che ha aperto un'ulteriore finestra su questo campo costituito dalle malattie dovute ad errore. Noi abbiamo acquisito nel corso del processo evolutivo una serie di molecole recettoriali che ci aiutano a difenderci dai patogeni; queste molecole però in conseguenza di una modifica profonda del modo di vita delle popolazione occidentali possono essere usate da molecole endogene.

La stimolazione prolungata di questi recettori difensivi porta a patologia. L'aterosclerosi è un altro classico esempio: lipoproteine ossidate (che probabilmente milioni di anni fa nessuno dei nostri predecessori vedeva nella sua vita) sono riconosciute da scavengers receptors che si sono evoluti nel contesto dei PRR.

Il TRL4, forse il più classico dei PRR, riconosce acidi grassi rilasciati dal tessuto adiposo ipertrofico e andato incontro a processi necrotici in individui che dal punto di vista evolutivo hanno conosciuto l'obesità qualche secolo fa, non prima.

La relazione tra stimolazione di PRR da parte di acidi grassi rilasciati dal tessuto adiposo si è recentissimamente arricchita con l'osservazione che probabilmente questo meccanismo è indiretto. E' stata identificata questa proteina, FatA, rilasciata dal fegato, che complessa acidi grassi circolanti e il complesso proteina-acidi grassi viene riconosciuto da TLR4 e determina l'attivazione di queste classiche vie di trasduzione del segnale che possono portare, nello stesso adipocita che esprime TLR4, all'attivazione di IKK e JNK e quindi allo spegnimento del segnale insulinico nell'adipocita stesso da una parte (quindi allo sviluppo dell'insulino-resistenza), e d'altra parte alla stimolazione del monocita a rilasciare citochine proinfiammatorie.

Questa questione dell'adiposite dopo le prime osservazioni si è complicata moltissimo; il tessuto adiposo è emerso come una sorta di organo immunologico in cui si trovano tutte le cellule dell'immunità adattativa e innata; il bilancio tra la presenza di diversi tipi di cellule condiziona gli stati di adiposite.

Nel tessuto adiposo magro sono prevalenti linfociti Th2, Tregs e queste sottopopolazioni di cellule NK (iNK), che sono popolazione i cellulari che producono prevalentemente IL-10 e IL-4, due citochine che sono considerate spegnere il processo infiammatorio e il reclutamento di monociti.

Man mano che il tessuto adiposo aumenta di dimensione (non è chiaro ancora perché) diminuiscono queste popolazioni cellulari e aumentano i linfociti Th1 e CD8+, che secernono citochine che favoriscono il reclutamento leucocitario e l'attivazione dei macrofagi, e soprattutto che modulano il fenotipo macrofagico.

Anche i macrofagi hanno infatti, come i linfociti, due fenotipi estremi chiamati M1 e M2. I macrofagi M1 secernono una serie di citochine proinfiammatorie, quindi hanno anche funzioni effettrici, producono elevate quantità di radicali dell'ossigeno e fagocitano attivamente, quindi spostano l'equilibrio verso una maggiore infiammazione.

I macrofagi M2 svolgono funzioni trofiche, cioè secernono citochine antinfiammatorie e secernono fattori di crescita che favoriscono la proliferazione cellulare.

Questa popolazione di macrofagi cambia, nel senso che maggiore è il processo di adiposite, maggiore è l'accumulo di macrofagi M1, mentre nel tessuto adiposo magro prevalgono i macrofagi con fenotipo M2.

Questa storia si è ulteriormente complicata,non solo con la sottolineatura del ruolo che hanno queste particolari NK, ma recentemente è stato visto che anche gli eosinofili svolgono un ruolo in questo contesto. Maggiore è la quota di eosinofili, che sono anch'essi in grado di produrre citochine antinfiammatorie, in particolare IL-4, minore è il reclutamento di monociti e sopratutto si ha spostamento verso il fenotipo M2 (non infiammatorio).

Esiste quindi un'immunologia del tessuto adiposo che ci evidenza l'importanza di diversi tipi di cellule; questa questione degli eosinofili è stata da alcuni subito estrapolata nel contesto dell'eccessiva pulizia dei paesi industrializzati: le parassitosi che erano tipiche del passato sono diminuite drammaticamente; le parassitosi comportano un aumento degli eosinofili circolanti e alcuni hanno interpretato questa cosa dicendo che le parassitosi (per esempio le macroparassitosi intestinali) ci proteggevano dal diabete di tipo II perché favorivano una maggiore infiltrazione di eosinofili nel tessuto adiposo.

2.Il secondo meccanismo molecolare dell'insulino-resistenza: che non passa esclusivamente attraverso il processo infiammatorio dell'adiposite ma prende in considerazione un ruolo diretto degli acidi grassi. Questo ruolo degli acidi grassi nella precedente lettura sarebbe un ruolo indiretto, attraverso il riconoscimento da parte di TLR4 a livello leucocitario macrofagico; sarebbe invece un effetto diretto degli acidi grassi su tessuti bersaglio dell'insulina, in particolare fegato e muscolo.

Il metabolismo degli acidi grassi comporta la formazione di una serie di intermedi che attivano le chinasi JNK IKK e PKCW: in questo contesto l'obesità sarebbe correlata allo sviluppo dell'insulina anche perché un aumento degli acidi grassi circolanti, in particolare acidi grassi saturi (questo sposta l'attenzione su una tradizionale vecchia informazione sulla tossicità di acidi grassi saturi, che si trovano nelle diete ricche di carni, mentre nelle diete ricche di vegetali si ha un eccesso di acidi grassi poliinsaturi) sarebbe in grado di mediare questa cosa.

Il metabolismo degli acidi grassi a livello mitocondriale, o per i meccanismi di accumulo, fa in modo che vengano formati acido isofosfatidico, acido fosfatidico e diacilglicerolo, che sono attivatori di quelle serin-treonin chinasi che spengono il segnale insulinaco.

Quindi gli acidi grassi avrebbero un effetto, oltre alle citochine prodotte dal tessuto adiposo, proprio in questi organi che rispondono all'insulina.

Un'informazione aggiuntiva: un particolare componente, la ceramide, un fosfolipide sintetizzato a partire dalla sfingomielina, è stato recentemente visto inibire AKT. Si tratta quindi di un meccanismo che non ha come bersaglio l'IRS, ma direttamente AKT.

3. L'ultimo sviluppo nel campo della resistenza all'insulina ci riporta a una problematica relativa all'attivazione dell'inflammosoma, basato su NLRP3, in diversi tipi di cellule, comprese le cellule beta pancreatiche.

Questa attivazione dell'inflammosoma è responsabile di un pathway di tipo infiammatorio e rilascio di IL-1b ma anche di una serie di fenomeni che presentano come bersaglio l'AMPK e l'inibizione della mitofagia (ciòè quel processo di rinnovamento dei mitocondri) che poi porta a un'eccessiva formazione di radicali e al danno delle cellule beta pancreatiche. Questa cosa deriva dal fatto che è stato visto un effetto diretto del glucosio

che si complessa a questa proteina, TXR, e dissocia questa da un'altra molecola che è in grado di attivare direttamente l'inflammosoma. La conseguenza di questo fenomeno, accoppiata al rilascio di acidi grassi dal tessuto adiposo, che attivano la via di NFkB e la sintesi della pro IL-1b, è legata alla liberazione di IL-1b e agli effetti infiammatori generati da questa molecola.

Questo evento interessante ha suggerito l'inflammosoma come possibile bersaglio terapeutico in nuove strategie. Questo disegno (immagine 37)riassume il fenomeno. Abbiamo già visto che AMPK favorisce processi autofagici, quindi la mitofagia, e indirettamente ha un effetto di inibizione dell'attivazione dell'inflammosoma.

E' importante fare una piccola parentesi: i mitocondri danneggiati sono stati visti rilasciare DNA mitocondriale e questo, in particolare il DNA mitocondriale modificato da processi ossidativi, è un attivatore diretto dell'inflammosoma.

Quindi c'è una convergenza di fenomeni per cui il danno mitocondriale, se non viene corretto da un efficace meccanismo mitofagico, può comportare un eccesso di infiammazione con il rilascio di DNA contenuto nei mitocondri e l'attivazione diretta dell'inflammosoma.

Da questo punto di vista forse una delle azioni della Metformina, fino ad adesso non apprezzate, è la sua capacità, favorendo i processi autofagici, di inibire l'attivazione dell'inflammosoma a livello delle cellule beta pancreatiche.

Questo (*l'attivazione dell'inflammosoma*) potrebbe spiegare l'evoluzione naturale del diabete di tipo II verso un diabete insulino dipendente.

L'altro aspetto è questo: alcuni acidi grassi, insaturi , possono inibire AMPK e l'autofagia e quindi i mitocondri malfunzionamenti producono radicali dell'ossigeno. Vi sono nuovi farmaci che si stanno studiando come potenziali farmaci nel trattamento del diabete che sono inibitori diretti dell'inflammosoma, e alcuni suggeriscono che si potrebbero usare anche farmaci che sono stati selezionati nel contesto di nuove strategie per il trattamento di processi infiammatori cronici, tipicamente l'artrite reumatoide, per esempio, che sono antagonisti dell'IL-1. Quindi questi pathway stanno emergendo come meccanismi importanti per la sperimentazione di nuovi farmaci.

4. L'ultima cosa che vi ricordo è che un altro meccanismo di attivazione delle chinasi che possono essere responsabili dell'infiammazione e quindi di produzione di citochine, ma possono anche, per esempio attivando IKK e JNK, alterare la risposta all'insulina è la unfolded protein response (UPR).

Un eccessivo danno al reticolo endoplasmico che si osserva nelle condizioni di iperalimentazione, e che può essere determinato anche dalla glucotossicità, finisce per innescare queste vie che portano all'attivazione di NFkb che da una parte attiva la trascrizione di geni proinfiammatori e dall'altra determina attivazione delle chinasi che fosforilano in serina IRS.

Leggetevi a casa con calma queste (immagine 39) due legende che cercano di fare una sintesi di questi processi.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 12/11/2012

Materia: Patologia generale e fisiopatologia clinica

Professore: Marco Antonio Cassatella

Sbobinatore: Alessio Mantovani

Revisore: Biagio Anselmi

12/11/2012

FLOGOSI ACUTA E FLOGOSI CRONICA

Può risultare utile riprendere la diapositiva della lezione precedente:

Sono da tenere a mente alcune variabili come le **cause** dell'infiammazione acuta, la **durata**, che può essere di poche ore o giorni (ma vi possono anche essere delle infiammazioni croniche che si riacutizzano) e le **caratteristiche biologiche** della flogosi acuta, cioè fenomeni che riguardano i vasi (il flusso e il calibro) e reclutamento di cellule (granulociti polimorfonucleati) dal sangue ai tessuti. Di conseguenza, l'infiltrato infiammatorio di una **flogosi acuta** si caratterizza da granulociti neutrofili, anche se la composizione può variare in relazione alla causa, mentre altre cellule mononucleate, come monociti, macrofagi e anche linfociti, caratterizzano la **flogosi cronica**.

In relazione alla suddetta diapositiva si può osservare quale sia il destino della flogosi acuta, in particolare essa può:

- risolversi;
- persistere (mantenendo le caratteristiche di una flogosi acuta);
- cronicizzarsi, perdurare nel tempo assumendo diverse caratteristiche bilogiche, quali quelle della flogosi cronica;

Una flogosi con le caratteristiche tipiche della flogosi cronica può comparire sin dall'inizio e può avere come cause infezioni di tipo virale, oppure può avere alle spalle una flogosi di tipo acuto, transiente, che spesso è difficile da individuare.

[Figura] Differenze tra **flogosi acuta** e **flogosi cronica**:

come si può osservare, la cronica si caratterizza da diminuzione dei fenomeni vasculo-essudativi e da cambiamento della cellularità; mentre nella flogosi acuta prevalentemente si possono infiltrare e migrare dal sangue granulociti neutrofili, nella flogosi cronica le cellule protagoniste sono altre, come i linfociti con le loro varietà, i monociti, i macrofagi, i fibroblasti, ecc.

La **flogosi cronica** è classificata in 2 gruppi: una detta **istogena in senso stretto**, l'altra **istogena connettivale o fibroblastica**.

1) La flogosi **istogena in senso stretto** segue la flogosi acuta ed è caratterizzata per cambiamento di cellularità: compaiono monociti appena reclutati dal sangue a vari stadi di maturazione, macrofagi, linfociti B e T che possono polarizzare e maturare verso cellule specializzate che producono diversi pattern di citochine a seconda del diverso agente eziologico, linfociti Th1, Th17, Th22, Th9, Treg e così via. Si possono poi avere vari tipi di granulociti: neutrofili, eosinofili, basofili, sempre in dipendenza della causa scatenante. Essa a sua volta si divide in: flogosi **interstiziale diffusa** e **granulomatosa**.

A) **Granulomatosa**: la classica flogosi cronica, con presenza di granulomi, anche se in realtà è sottogruppo della flogosi istogena. Si forma una nuova struttura che dà origine a tessuto detto granuloma, che ha caratteristiche specifiche per determinata causa (tubercolare, di origine batterica, virale…). E' un ammasso organizzato di macrofagi a vari stadi di maturazione con determinate caratteristiche e vi possono essere anche linfociti distribuiti con diverse caratteristiche.

B) **Flogosi interstiziale diffusa**: sono causate da infezioni virali o anche altre patologie in cui si ha reclutamento e infiltrazione diffusa di cellule mononucleate nel tessuto colpito, che spesso si localizzano intorno ai vasi; può evolvere nella granulomatosa.

2) I due tipi di flogosi istogena in senso stretto possono poi evolvere nella **flogosi istogena connettivale o fibroblastica**, cioè riparativa. Molto spesso a seguito di flogosi cronica o di granuloma che provocano distruzioni tissutali, i mediatori prodotti dalla flogosi diventano molto importanti per la <u>riparazione</u>, con aumentata proliferazione di fibroblasti, coinvolgimento delle cellule endoteliali, attivazione della formazione di nuovi vasi (neoangiogenesi), che mira a produrre nuovo tessuto: tessuto connettivo, che va a sostituire il tessuto necrotico eventualmente perso. Non c'è dubbio che questo tessuto fibrotico può poi contribuire alla *functio laesa*, se sostituisce gran parte del tessuto, o ad altre situazioni patologiche. La flogosi istogena serve per portare a guarigione.

Se però la flogosi acuta non è in grado di eliminare la causa che l'ha scatenata, allora scatta un secondo tipo di risposta: la flogosi cronica. Essa si sviluppa perché vi sono cause ineliminabili dai meccanismi messi in atto (reclutamento di neutrofili, attivazione di sistemi locali solubili, risposte tissutali non sono in grado di eliminare la causa), quindi vengono adottati meccanismi diversi che dovrebbero risultare più potenti, quindi reclutamento di monociti, cellule dendritiche, leucociti, la risposta immunitaria specifica (che caratterizza la flogosi cronica) finchè si riuscirà ad eliminare la causa. Si impiega la flogosi cronica perché la causa non è stata eliminata dalla flogosi acuta, poi se tutto procede correttamente si passa alla terza fase che è quella della flogosi riparativa,

caratterizzata dalla produzione di tessuto riparativo connettivo, giovane, e poi fibrotico man mano che invecchia, fino ad evolvere verso la sclerosi.

CAUSE

Alcune provocano una flogosi acuta con le sue caratteristiche tipiche, altre provocano fin dal principio una flogosi con caratteristiche croniche (almeno apparentemente): infezioni virali, infezioni croniche, cause che persistono nel tempo, malattie autoimmunitarie, cause sconosciute. Da qui la situazione si può **risolvere**, quindi ritornare alle normali funzioni del tessuto, oppure la flogosi cronica può portare alla riparazione con tessuto connettivo che va a sostituire quello funzionale evolvendosi in **fibrosi**, oppure l'infiammazione può persisitere nel tempo, quindi **cronicizzare**, mantenendo però le caratteristiche biologiche dell'infiammazione acuta che può evolvere in vari quadri, per esempio la formazione di ascessi che sono ricchissimi di neutrofili morti, necrotici o apoptotici, oppure evolvere anch'essa verso la produzione di materiale, quindi fibrosi.

SINTOMATOLOGIA

[Tabella] La flogosi è molto importante perché gran parte della sintomatologia di molte malattie dipende proprio da fenomeni flogistici. Sono comprese:

- malattie infettive, in cui da una parte l'infiammazione e la <u>flogosi</u>, dall'altra la <u>tossicità dell'agente infettivo</u> contribuiscono alla patogenesi del danno (dissenteria batterica, epatite acuta, filariasi, gastrite da H. pylori, lebbra, tubercolosi, ecc.);
- malattie che fino a 20-30 anni fa si ritenevano patologie non infiammatorie, invece ora è chiaro che la flogosi ha un ruolo dominante a causa di processi infiammatori alterati, tanto è vero che al giorno d'oggi si curano con farmaci che vanno ad inibire <u>mediatori infiammatori</u> in maniera specifica. Tra queste ricordiamo l'anafilassi, le risposte allergiche acute, l'artrite reumatoide, l'asma, l'aterosclerosi, colite ulcerosa, diabete tipo I, gotta, il lupus, malattia di Chron, psoriasi: tutte patologie che, sapendo qual è il mediatore alterato alla base, possono essere curate tramite inibitore di esso;
- patologie di diversa origine, tra le quali la fibrosi post-infiammatoria rappresenta la principale causa di danno: sono tutte malattie che si sviluppano a seguito di una fase riparativa che poi evolve in sclerosi. Ricordiamo la cirrosi epatica, l'epatite acuta da virus e la fibrosi polmonare, che alla base hanno infiammazione cronica, disordini metabolici, disordini neurologici, malattie del sangue, disordini cardiovascolari, diabete, una serie di patologie infiammatorie croniche ad eziologia ancora sconosciuta, malattie scheletriche e anche sviluppo di tumori.

[Slide] Vi sono patologie ben precise, come schistosomiasi, malattie da *Papillomavirus*, gastriti da *H. pylori*, epatiti da virus tipo B e tipo C (quindi malattie infettive), ma anche infiammatorie non infettive come il fumo di sigaretta, che predispongono allo sviluppo di patologie neoplastiche di tipo maligno con associazione stretta. Questa associazione con l'infiammazione rappresenta oggi uno degli *hallmarks* della malattia "cancro" oltre a proliferazione incontrollata, capacità di resistere a meccanismi soppressori della proliferazione, immortalità cellulare, capacità delle cellule tumorali di indurre angiogenesi, capacità di resistere all'apoptosi e di invadere altri tessuti e formare tumori secondari (metastasi), elencati già nel 2000. Alla base di questi concetti ci sono le alterazioni genetiche, che conferiscono alle cellule tumorali queste capacità.

Negli scorsi anni, 2010-2011, le hallmarks sono aumentate fino a contemplare anche il ruolo dell'infiammazione, che oggi è riconosciuta come una situazione che può predisporre allo sviluppo di tumore. Si stanno conoscendo sempre più a fondo quali sono i meccanismi alla base dello sviluppo di tumore a partire dall'infiammazione: in sostanza vi sono delle **condizioni intrinseche** e delle **condizioni estrinseche**.

Tra le **intrinseche** vi sono le mutazioni geniche, che attivano geni che sono in grado di promuovere proliferazione incontrollata attivando fattori di trascrizione: tra i vari geni coinvolti ve ne sono molti che mediano processi infiammatori. Le molecole coinvolte sono citochine, chemochine, mediatori di origine lipidica prodotte dalle cellule tumorali che reclutano cellule infiammatorie, come macrofagi, neutrofili, eosinofili, monociti, ecc. Nell'ambiente tumorale questi mediatori attivano in parte le cellule infiammatorie reclutate in modo pro-tumorale, quindi il tumore "schiavizza" queste cellule che, invece di aver funzione protettiva, vengono stimolate a produrre gli stessi fattori di trascrizione e gli stessi mediatori che hanno degli effeti pro-tumorali.

Un'altra via è quella dell'infiammazione **estrinseca** in cui si ha infiammazione o infezione in cui si producono mediatori che continuano a reclutare queste cellule che col tempo, liberando mediatori, prepareranno il terreno allo sviluppo di cellule tumorali.

Diapositiva:

L’infiltrato linfocitario produce mediatori che danno ambiente infiammatorio, favorendo la progressione e lo sviluppo del tumore. In particolare il risultato sia della via intrinseca sia della via estrinseca sarà la maggior proliferazione e sopravvivenza cellulare, la transizione epitelio-mesenchimale, la formazione di nuovi vasi e anche vasi linfatici. Queste cellule producono pure radicali liberi dell’ossigeno e dell’azoto che possono arrecare danno al DNA, alterando e mutando geni che favoriscono la promozione tumorale.

Vi sono numerosi pazienti affetti da bronchiti, esofagiti, enfisemi cronici che hanno aumentata incidenza di tumori, a causa dei seguenti meccanismi: aumento della proliferazione cellulare legato all’azione dei mediatori, aumento dei metaboliti dell’ossigeno e dell’NO, attivazione immune cronica con produzione continua di citochine ed infine le cellule infiltrate possono produrre fattori di crescita che inducono la produzione di nuovi vasi.

Quindi l’infiammazione da danno tissutale è una condizione che da una parte ha un effetto positivo per azionare i meccanismi che devono eliminare la causa che ha danneggiato il tessuto e per produrre mediatori che stimolino la rigenerazione; ma allo stessso tempo una risposta infiammatoria cronica, incontrollata, esagerata. Questa, legata ad altri fattori predisponenti collegati all’individuo, può avere conseguenze patologiche: fenomeni autoimmunitari, danni tissutali gravi oppure infiammazione incontrollata può causare shock settico e infiammazione cronica può causare altre patologie, come fibrosi (che può arrivare alla sclerosi), metaplasia (sostituzione del tessuto proprio dell’organo con un tipo diverso) oppure sviluppo di tumori.

Riguardo alle neoplasie, la risposta immunitaria è messa in atto proprio per combatterle, ma con il passare del tempo il tumore riesce a sovvertire la risposta e volgerla addirittura verso la carcinogenesi.

FLOGOSI ACUTA - Meccanismi patogenetici

ANGIOFLOGOSI

Si sviluppa a livello del microcircolo e coinvolge cellule e sistemi polimolecolari solubili.

[Immagine] Un tipico microcircolo è caratterizzato dalle arteriole terminali, avvolte da cellule muascolari lisce, poi metarteriole che confluiscono in canali deferenziali che infine danno origine a capillari, i quali non sono tutti pervi. Infatti solo alcuni capillari sono normalmente aperti perché l’apertura e la chiusura si trovano sotto il controllo del tono degli sfinteri precapillari, regolati da vari mediatori. I capillari confluiscono poi nei canali deferenziali e in seguito nelle venule (mancano entrambi di tessuto muscolare liscio). All’interno dei letti capillari avviene scambio di soluto, ma la microcircolazione è controllata sia a livello **neurogeno**, cioè dall’innervazione che però non arriva all’interno dei capillari ma si ferma prima (alle arteriole), e poi a livello di **mediatori chimici** liberati localmente a seconda della necessità di scambio di sostanze.

Vi sono quindi mediatori **vasocostrittori**, che sono catecolamine (adrenalina e noradrenalina), Ca^{2+}, trombossani (prodotti dalle piastrine), endoteline, e poi **vasodilatatori** (prodotti a livello locale da cellule che risiedono nel tessuto, per esempio mastociti, e poi trasportati dal sangue) che sono NO, istamina, chinine, altri metaboliti di origine lipidica come prostaglandine e leucotrieni (prodotti dall’endotelio e dai leucociti, generati dal metabolismo dell’acido arachidonico), ma anche alterazioni del pH, infatti pH acido ha azione vasodilatatoria, poi livelli della tensione di ossigeno, concentrazione di CO_2, di ioni, nucleotidi ciclici come AMP ADP ATP che sono prodotti dalle cellule ma anche dal tessuto nervoso. Si costituisce dunque un bilanciamento nella concentrazione di questi mediatori per aprire in maniera intermittente i capillari e controllare lo scambio con i tessuti.

Un patologo tedesco, Rudolph Virchow, già prima del ‘900 aveva condotto studi su modelli animali per studiare i meccanismi della flogosi, in particolare su tessuti trasparenti come la lingua di rana, oppure peritoneo isolato. Al giorno d’oggi si usano invece dei mezzi più sofisticati che consentono di osservare direttamente la risposta della cellula grazie alla microscopia. Virchow, invece, dopo aver isolato del tessuto nei suoi esperimenti lo danneggiava [*per esempio con spilli ndr*], per indurre un’infiammazione acuta. In seguito descrisse la sequenza degli eventi formulando le varie fasi della flogosi acuta: 1) **modificazioni vascolari** (aumento nel calibro dei vasi, del flusso sanguigno e delle componenti intravasali) 2) **modificazioni della barriera sangue-interstizio** (fuoriuscita dai vasi di macromolecole plasmatiche e liquidi, quindi essudazione) 3) **migrazione dei globuli bianchi**. [Figura]

1) **Modificazioni vascolari**, si hanno in sequenza: 1) **vasocostrizione arteriolare**, con aumento del calibro della microcircolazione *in toto* e aumento del flusso 2) **iperemia attiva**, che dà distensione della microcircolazione, con eritema che è rossore della cute 3) **iperemia passiva**, cioè continuo aumento della massa sanguigna ma più per stasi (quindi il sangue è prevalentemente venoso). Questa iperemia passiva culmina in una diminuzione del flusso in uscita, perché poi interviene l'essudazione che comprime i vasi e favorisce ulteriormente la stasi.

[Slide] **PATOGENESI DELLE MODIFICAZIONI DEL CALIBRO E DEL FLUSSO VASCOLARE**

Avviene in 3 fasi: 1) vasocostrizione arteriolare 2) vasodilatazione con iperemia attiva 3) iperemia passiva.

1) **Vasocostrizione arteriolare**. Consiste di una breve e transiente costrizione delle arteriole terminali che produce una ipoperfusione transitoria, che però non sembra essere rilevante nei processi infiammatori. Essa è causata da una stimolazione diretta delle cellule muscolari lisce, che avvolgono le arteriole, da parte dell'agente flogogeno così come dalla liberazione iniziale di vari mediatori, come le catecolamine dai terminali nervosi, le endoteline e i trombossani da parte delle piastrine. I trombossani antagonizzano le prostacicline, prodotte invece dalle cellule endoteliali.

2) **Vasodilatazione con iperemia attiva**. A seguito di vasocostrizione arteriolare che rappresenta la via di *default*, si ha vasodilatazione che consiste in una marcata dilatazione che interessa arteriole, capillari e venule e aumenta così il flusso sanguigno nel microcircolo. Le arteriole si dilatano per rilassamento della muscolatura liscia a causa di mediatori liberati in loco sia dai vasi sia dal tessuto, quindi dagli endoteliociti danneggiati, dai mastociti dei tessuti vicini (importantissimi perché contengono mediatori preformati nei granuli) che possono liberare i mediatori nel giro di secondi o minuti, come l'istamina, poi le chinine, C5a e C3a (per orchestrare la risposta infiammatoria acuta), PGA2 (prostaglandina) prostacicline e endoperossidi (tutti dal metabolismo dell'arachidonato), la sostanza P liberata dalle terminazioni nervose, acido arachidonico, NO e l'anione superossido [*non si capisce NdR*]. Si individuano inoltre metaboliti locali come CO_2, nucleotidi ciclici e si ha pure il contributo del sistema nervoso grazie al cosiddetto riflesso assonico, cioè con flusso antidromico arrivano segnali alle cellule nervose che rilasciano mediatori come sostanza P, ATP che vanno a stimolare i mastociti localizzati vicino ai capillari, con liberazione di istamina e feedback positivo tra questi meccanismi.

I capillari subiscono l'effetto del flusso, con l'arrivo della massa di sangue per apertura delle arteriole, quindi vi sarà adeguamento del numero di capillari pervi con apertura di essi: ecco che si verifica l'eritema.

Infine si allargano anche le venule, sia per l'arrivo della massa di sangue sia per l'azione dei suddetti mediatori vasodilatatori, che ovviamente vanno ad agire su quelle cellule circondate da fibrocellule muscolari lisce.

3) **Vasodilatazione con iperemia passiva**. Si ha accumulo di sangue nel letto capillare e ad un certo punto si ha la fuoriuscita di liquido dai vasi, quindi edema che provoca compressione a livello delle venule con impedito scarico e aumento della viscosità del sangue, con scomparsa dello strato plasmatico periferico e aggregazione dei globuli rossi. Come conseguenza dell'aumento del flusso e della fuoriuscita di liquido (formazione di edema) i globuli rossi si impaccano e contribuiscono all'attrito che impedisce il flusso. In seguito il flusso sarà ulteriormente ostacolato dall'adesione dei leucociti, quindi si produrrà ulteriore edema e aumento della viscosità sanguigna. In aggiunta si può verificare adesione delle piastrine che possono causare dei piccoli trombi.

Ricordiamo che la vasodilatazione è importante per la formazione dell'essudato e per la migrazione dei leucociti, ma non è indispensabile, poiché vi sono altri meccanismi specifici.

2) **Modificazione della barriera sangue-interstizio**

Si tratta di una modificazione per aumentare la permeabilità per facilitare la fuoriuscita di liquido e macromolecole plasmatiche dai vasi ai tessuti. Si parla di essudazione per quanto riguarda la flogosi acuta; qui parliamo della formazione di **edema essudatizio**, cioè accumulo di liquido a livello interstiziale che a seconda della composizione viene chiamato trasudato (ha caratteristiche proprie) o essudato (che è quello prodotto in seguito a risposta infiammatoria).

[Slide] Avviene scambio sia di liquidi che di soluti: lo scambio dei **soluti** avviene a livello della microcircolazione per processo passivo che avviene per diffusione, mentre lo scambio dei **liquidi** è regolato dall'equilibrio tra le pressioni idrostatiche e quelle osmotiche ai due lati della barriera. Vi sono infatti delle forze che regolano l'uscita di liquido: sia forze che tendono a farli uscire come la **pressione idrostatica**, sia forze che trattengono i liquidi come la **pressione oncotica** data dalla concentrazione delle proteine nel sangue. Si costituisce dunque una condizione per cui all'estremità arteriosa prevalgono le forze che tendono a far fuoriuscire i liquidi, mentre all'estremità venosa quelle che tendono a farli rientrare, nonostante la pressione oncotica sia

comunque uguale in tutto il distretto. Questo perché il fattore che varia alle estremità arteriose è la pressione idrostatica, che è >25 mmHg a livello delle estremità arteriose mentre è

[Slide] A livello delle **arteriole terminali** abbiamo una serie di forze che tendono a far fuoriuscire i liquidi: pressione idrostatica 30 mmHg, la pressione interstiziale del tessuto 5.3 mmHg (che è negativa quindi tende a far fuoriuscire il liquido), la pressione colloidosmotica del tessuto 6 mmHg (legata alla concentrazione di proteine). La somma è 41 mmHg. L'unica forza in questo ambito che tende a far rientrare il liquido è la pressione colloidosmotica, 28 mmHg, quindi dalla somma delle forze la forza risultante favorirà l'uscita di liquidi.

Invece a livello dei **capillari venosi e** delle **venule** abbiamo sempre la pressione colloidosmotica legata a proteine costante, 28 mmHg; quello che cambia sono le forze che tendono a far fuoriuscire il liquido, in particolare sono le stesse per il tessuto interstiziale, mentre cambia la pressione idrostatica a 6.7 mmHg (negativa), per cui la forza totale fa entrare i liquidi. Questi meccanismi regolano l'80-90% dello scambio di liquidi a livello della microcircolazione, poi c'è il contributo dei vasi linfatici che riassorbono una quota dei liquidi fuoriusciti a livello delle arteriole terminali (10-15-20%).

PATOGENESI DI TRASUDATO ED ESSUDATO

Nel caso invece di **infiammazione acuta** si avrà una fuoriuscita massiva di liquidi verso i tessuti, che prenderanno il nome di essudato. Quindi da una parte vi è stato uno spostamento delle forze che favoriscono l'uscita verso l'esterno, ma la spiegazione principale è che cambia proprio la barriera sangue-tessuto, quindi la permeabilità si modifica e favorisce la fuoriuscita di liquido e proteine, che si accumulano nel tessuto. Nei tessuti aumenterà quindi la pressione colloidosmotica che favorirà ancora di più il richiamo di liquidi.

[Slide] A proposito dell'edema, si può distinguere tra **trasudato** ovvero aumento dei liquidi in assenza di modificazioni della barriera, oppure **essudato** che è legato ad aumento di liquido ricco di proteine per alterazione della barriera. Alcuni esempi: un edema *trasudatizio* può risultare da semplice aumento della pressione idrostatica (per ostruzione delle vene oppure per insufficienza cardiaca) oppure tutte le patologie che determinano diminuzione della pressione colloidosmotica, quindi quelle che determinano ridotta sintesi proteica come malattie del fegato, acute o croniche come le epatiti (che danno ascite) o malattie del rene (proteinuria); per modificazione della barriera come abbiamo visto appunto con l'infiammazione cronica si ha più che altro formazione di *essudato*.

Si può formare edema anche senza evidente alterazione della barriera, portando allo sviluppo di **trasudato**: è il caso di insufficiente drenaggio linfatico, a causa magari di filariasi o danno chirurgico ai vasi; ritenzione di sodio, ione che favorisce l'espulsione di acqua dai vari tessuti; modificazioni della barriera endoteliale. Il liquido che si accumula nell'interstizio è ricco di proteine e talvolta cellule, ma solo quando il danno è più grave.

[Tabella] Le proteine maggiormente rappresentate nel sangue sono l'albumina e le globuline nelle concentrazioni rispettivamente di 4.5g/100ml e 2.5g/100ml, quindi una media di 7g/100ml: è questo valore che contribuisce in gran parte a determinare la pressione colloidosmotica. Pleurite acuta e idrotorace sono due condizioni infiammatorie acute, distinte dalla concentrazione di proteine nel liquido: nella pleurite, caratterizzata da essudato, la concentrazione di proteine è simile a quella del sangue; nel trasudato dell'idrotorace invece c'è una concentrazione molto bassa, simile alla normale concentrazione di quel tessuto, ma aumentano tantissimo le globuline sieriche, quindi gli anticorpi.

CAUSE

Per quanto riguarda le cause che determinano aumento di permeabilità esse sono molte. Una causa chiave è quella legata alla contrazione degli endoteliociti a causa dell'azione di mediatori, principalmente istamina, formando dei pori che determinano fuoriuscita di proteine. La stessa azione è svolta anche da altri mediatori come NO, da mediatori di origine plasmatica come complessi polimolecolari solubili, C3a e C5a del complemento che comunque vanno a stimolare i mastociti per il rilascio di istamina. Questo avviene principalmente nelle venule, oltre ad essere una risposta di tipo rapido e di breve durata. La stessa risposta potrebbe essere causata da danno agli endoteliociti e ciò ovviamente è una situazione più grave: si può avere **danno diretto** da parte della causa e può avvenire a qualunque livello a seguito di scottature, infezioni microbiche e durare da ore a giorni; oppure si può avere **danno indiretto** causato da leucociti migranti che danneggiano le cellule endoteliali, con aumento della permeabilità; influisce anche l'aumento della transcitosi.

Intervengono anche altri meccanismi come l'aumento della pressione idrostatica intravasale, l'osmolarità all'esterno dei vasi, l'uscita di proteine, scissione di proteine ad opera di enzimi proteolitici, accumulo di metaboliti, presenza di molecole denaturate derivate da cellule morte, scissione delle molecole del connettivo.

E’ possibile studiare questi fenomeni tramite colorazioni e iniezioni di sostanze colorate, inducendo artificialmente l’infiammazione, oppure a livello più specifico bloccando certi processi utilizzando dei farmaci.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 13/11/2012

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 13/11/2012

____

Lezione di Patologia,

Professor Cassatella, 13 novembre 2012

Mariachiara Mennucci

-

-

ESSUDATO INFIAMMATORIO ACUTO

Essudat**i infiammatori :**

Produzione di sostanze tossiche che poi andranno a uccidere e degradare il microrganismo, l’essudato viene poi assorbito dai vasi linfatici agevolando il trasporto degli antigeni ai linfonodi per favorire la produzione di una risposta immunitaria specifica.

Localizzazione di essudati infiammator:

Possono infiltrare il tessuto .

Ascesso: formazione e raccolta di pus in una cavità neoformata

Empiema: essudato che si localizza, si versa, in una cavità preformata: pleurica, pericardica, peritoneale. O negli organi cavi: colecisti, vescica, intestino.

Può rimanere localizzato sulla superfice di una mucosa o sierosa.

Può creare canali di comunicazione con l’esterno oppure può mettere in comunicazione due cavità preesistenti tramite Fistole che sono veri e propri canali.

Composizione di un essudato infiammatorio acuto :

Fluido e cellule che al 95 % sono rappresentati da granulociti neutrofili.

Il fluido contiene: sali, un‘alta concentrazione di proteine qualitativamente simili a quelle del plasma come complemento , fibrina, immunoglobuline. In molti casi il fluido contiene prodotti di scissione del collageno e mediatori dell’infiammazione derivati sia dal plasma che da cellule e dall’attivazione delle cellule che producono queste molecole .

Tipi di essudato: seconda del tipo di essudato parliamo di infiammazione sierosa (scottature), catarrale (molto muco), fibrinosa (accumulo fibrina) , emorragica (nell’ essudato ci sono molti globuli rossi) purulenta (essudato ricco di pus).

esempio di essudato fibrinoso con in evidenza vari tipi di leucociti alcuni in via di disfacimento , la fibrina, e alcuni neutrofili e monociti.

Ascesso dentario con un ammasso di callociti e pus

Vescica con essudato sieroso.

Edema della laringe con ingrossamento della stessa , molto pericoloso perché può determinare ostruzione delle vie aeree o intestinali.

Infiammazione della cavità pericardica con reti di fibrina

Essudato purulento in una delle meningi

Tappi di fibrina in ulcere nel cavo orale.

-

MIGRAZIONE DEI LEUCOCITI NELL'INFIAMMAZIONE

Meccanismi molecolari che regolano la Migrazione dei globuli bianchi nell' infiammazione acuta:

Immagine al microscopio colorata con ematossilina-eosina di un tessuto infiammato che evidenzia la migrazione dei globuli bianchi.

Nella flogosi acuta il fenomeno della migrazione dei globuli bianchi riguarda soprattutto granulociti neutrofili

Figura che esplica la trasmigrazione dei leucociti dal sangue ai tessuti: fenomeno che riguarda i leucociti durante la flogosi ma anche altre cellule ad esempio nel processo della metastasi le cell tumorali metastatiche che riescono a staccarsi dal tessuto primario e se diventano in grado di acquisire una serie di proprietà tali per cui diventano in grado di creare metastasi, probabilmente, ma non è stati ancora chiarito, utilizzano dei meccanismi simili per andare ad organizzarsi in altri distretti e determinare la metastasi in sedi secondarie .

Un leucocita neutrofilo dal sangue migra nei tessuti con un processo di migrazione che avviene tramite mediatori prodotti a livello della sede infiammatoria del danno, prodotti dalle cellule T e dalle cellule del tessuto.

La fuoriuscita dai vasi è regolata da una serie di tappe ed eventi ciascuna delle quali necessaria alla successiva : tal volta la sequenza si ferma, altre volte non può che andare avanti.

Ci sono delle tappe critiche.

La MARGINAZIONE: è un fenomeno normale, un pool di granulociti neutrofili vengono marginati in alcuni distretti adesi alle pareti endoteliali dei vasi, un pool che può essere facilmente liberato da alcuni farmaci, es: glucocorticoidi: a seguito di iniezione dei quali si verifica un innalzamento del numero di leucociti nel sangue in pochi minuti. Non vengono quindi prodotti ex novo dal midollo ma vengono liberati dai tessuti dal pool di cellule marginate.

Durante una risposta infiammatoria, a causa delle condizione che si verificano, c'è una spremitura dei leucociti dal centro alla periferia grazie alle informazioni ricevute dai mediatori a livello endoteliale che favorisce il processo della fuoriuscita e della migrazione.

Figura con tre meccanismi che inducono la Marginazione leucocitaria nelle venule (dove avviene prevalentemente la migrazione dei leucociti):

- I globuli rossi spremono fuori i leucociti verso la periferia

- C'è una tendenza grazie al flusso a favorire l'adesione del leucocita alla periferia

- L'impacchettamento dei globuli rossi fanno spostare i leucociti dal flusso centrale a quello periferico favorendone l'incontro con le cellule endoteliali.

La marginazione si accentua durante la modificazione nel flusso vascolare durante la flogosi acuta.

Fattori di regolazione del reclutamento leucocitario: molecole di adesione e sostanze in grado di attivare sia l'endotelio che i leucociti che sono i protagonisti di questo fenomeno.

Queste sostanze in generale si definiscono come fattori chemiotattici e sono prodotti dalle cellule endoteliali e dei tessuti e hanno la capacità di richiamare una cellula lungo un gradiente di concentrazione (quando un leucocita o granulocita esce dal vaso e deve andare alla sede del danno).

Oltre a questa azione regolano anche il reclutamento leucocitario.

Le fasi che determinano la fuoriuscita dei leucociti: sono dettate dalla funzione dei mediatori rilasciati a livello del sito di flogosi:

TETHERING (toccamento)

ROLLING (rotolamento)

ATTIVAZIONE DEL LEUCOCITA

ADESIONE FERMA

DIAPEDESI (fuoriuscita della cellula, migrazione)

Le fasi regolate da molecole di adesione che possono essere espresse a livello delle cellule endoteliali o anche dei leucociti e diverse sono le molecole di adesione che regolano le diverse fasi nel tempo.

Dopo la marginazione le prime fasi sono il **TETHERING** e il **ROLLING**

Normalmente le cellule nel sangue non sono attivate ma sono in Resting, al massimo in tethering ma il processo non va avanti: se esiste una condizione infiammatoria la cellula comincia a rotolare (rolling) ed eventualmente va avanti verso l adesione ferma (sticking).

Il tethering e il rolling sono regolati da molecole che si chiamano SELECTINE e sono espresse sia dai leucociti che dalle cellule endoteliali, hanno un dominio lectinico nella porzione extracellulare e interagiscono con ligandi a livello dell'altra cellula della controparte, che sono molti ricchi di zuccheri, glucidi.

Ci sono tre tipi di selectine:

- L-selectine espresse esclusivamente dai leucociti, da tutti , non solo i neutrofili
- E-selectine possono essere espresse dalla cellule endoteliali
- P-selectine può essere espressa dalle piastrine ma anche dalle cellule endoteliali

Le molecole presentano una serie di domini condivisi da tutti e tre e tipi.

Le E selectine e le P selectine espresse dagli endoteliociti: non vengono espresse se non a bassissimi livelli in determinati ristretti nello stato di resting cioè non flogistico. Le cell endoteliali devono essere stimolate da qualche mediatore pro infiammatorio per la loro espressione. Ecco perché il leucocita riconosce le cellule endoteliali e fa il rolling: perché normalmente le selectine non ci sono. Espresse sugli endoteliociti sono riconosciute dal leucocita

La P-selectine è immagazzina all'interno della cellule endoteliali in alcuni granuli detti i corpi di Weibel-Palade e possono essere rapidamente espresse sulla superficie cellulare in seguito a stimolazione (istamina, trombina) nel giro di pochi minuti (fenomeno rapido).

Anche le E selectine non sono espresse costitutivamente dalle cellule endoteliali: in seguito a stimoli che sono diversi come ad esempio le citochine pro infiammatorie TNF e IL-1 (sono oggetto di terapie molto efficaci quindi molto importanti). In questo caso la loro espressione richiede un po' più di tempo (ore) perché la E-selectina deve essere attivata a livello della trascrizione.

Le cellule endoteliali potenzialmente possono esprimere le E o P selectine, piu rapidamente o meno.

Il leucocita (neutrofili, monociti, leucociti etc) esprime invece le L selectine (LAM-1;LEU-8).

Alcune coppie di ligandi che interagiscono tra di loro in tabella; gli stessi meccanismi regolano anche il ricircolo dei linfociti nei vari distretti linfatici.

Seconda tabella con diversi ligandi possibili per le varie L selectine a seconda dell espressione della cell secondo in quale distretto la cell va a localizzarsi.

Il tethering and rolling avviene nel momento in cui c’è una risposta infiammatoria, perché normalmente le cellule endoteliali nel resting non esprimono selectine quindi normalmente il leucocita non può interagire con l’endotelio. Quando le selectine sono espresse il leucocita riconosce le molecole di adesione e comincia a rotolare.

Il **rolling** è definito adesione instabile perché il leucocita rotola ma non aderisce completamente all’endotelio. Infatti queste adesione selectine –ligandi determina interazioni molto instabili per cui il processo può anche non completarsi e il leucocita può anche tornare in circolo.

Affinché il leucocita proceda nella cascata di eventi e arrivi alla fuoriuscita deve accadere qualcos’altro: attivazione dell’endotelio cui segue l’espressione delle selectine sulla superficie cellulare .

Fattori attivanti l’endotelio sono:

1) Istamina, H2O2, trombina, che provocano l'attivazione entro minuti con espressione di P-Selectine per secrezione dai granuli di Weibel-Palade.

b) Citochine (TNF, IL-1, GM-CSF), o LPS, che provocano l'attivazione, dopo ore, con espressione di E-Selectine.

Le interazioni si verificano tra:

- selectine leucocitarie e selectine endoteliali

- selectine leucocitarie e glucidi espressi sull'endotelio (sialil-Lewisx, glicolipidi solforati, mono e polisaccaridi fosforilati)

- selectine endoteliali e glucidi espressi sui leucociti (idem)

L’adesione via selectine dura poco perché è mediata da legami deboli e perché, dopo attivazione, le selectine si staccano dalla superficie dei leucociti.

STICKING o adesione ferma: relazione molto stabile con la cellula endoteliale e una volta che avviene l’adesione ferma il leucocita andrà avanti nel processo fino alla fuoriuscita.

E’ mediata da altre molecole di adesione : le Integrine, principalmente le beta1 (VL4) e beta2.

Le Integrine sono molecole includono la famiglie di molecole di adesione espresse sulla cellule endoteliale, ma anche su tante altre cellule e sono dimeriche composte da una catena alfa e una catena beta

Attraversano la membrana e sono in grado di mediare direttamente un segnale intracellulare nel caso in cui siano legate a controligandi.

Le Integrine si raggruppano in sottofamiglie sulla base della catena beta: ci sono tantissime catena alfa e un numero minore di catene beta.

Ciascuna catena beta può legare diverse catena alfa.

Quelle di maggiore interesse sono le Integrine beta 2 (CD18) fondamentali per l'adesione ferma dei leucociti, sono in grado di legare 4 diverse catene alfa. AlfaL (CD11a), alfaM (CD11b), alfaX (CD11c), alfaD (CD11d).

Rispettivamente:

CD11a-CD18 (LFA1)

CD11b-CD18 (Mo1, MAC1, CR3)

CD11c-CD18 (p150,95, CR4)

CD11d-CD18

I ligandi delle integrine sono proteine che sono in grado di riconoscere diverse sequenza amminoacidiche che sono presenti in molecole svariate (collagene, laminina, fibronectine etc) e proteine della matrice extracellulare (importante perché attiva i leucociti una volta che escono dai vasi e ne può aiutare il movimento verso la sede flogistica)

Vedi tabella per le funzioni.

Le integrine a livello della cellula endoteliale riconosco le proteine di adesione ICAM che appartengono alla superfamiglia delle immunoglobuline dato che presentano domini globulinici delle Ig, alcune di queste sono importanti per la regolazione della adesione ferma (ICAM1-2-3-4, VCAM1, MadCAM 1): sono espresse dall'endotelio dopo attivazione da parte di mediatori.

In tabella si vedono quali sono rispettivamente i ligandi di queste proteine.

Queste interazioni delle molecole di adesione tra cell endoteliali e leucociti indirizzano il reclutamento e differenziamento dei leucociti nelle diverse risposte infiammatorie.

L'adesione ferma che segue il rolling è un processo più complicato e più finemente regolato di quanto detto fin ora perché le Integrine espresse costitutivamente sulla superfice dei leucociti devono essere attivate per poter riconoscere il ligando sulla cellule endoteliali: esiste quindi una tappa intermedia tra il rotolamento e l'adesione ferma ed è appunto l'**attivazione delle integrine:** solo dopo essere state attivate diventano in grado di riconoscere le ICAM sull'endotelio.

Il fenomeno dell'attivazione delle integrine:

Quando il linfocita rotola, affinchè le integrine si attivino, deve incontrare un fattore chemiotattico che viene esposto sulla superfice della cellula endoteliale.

Ci deve essere quindi la produzione di questo fattore chemiotattico che deriva dalla stimolazione della cellula endoteliale stessa da parte di mediatori.

Il fattore chemiotattico riconosce un recettore espresso dal leucocita (neutrofilo) per poter mandare un segnale intracellulare che va ad attivare delle Integrine.

L'attivazione è una modificazione conformazione della molecola Integrina: se non avviene questa attivazione c'è l arresto della sequenza di migrazione a livello dell'adesione ferma.

Altra immagine con un modello dove un granulocita neutrofilo esprime delle integrine ma è incapace di riconoscere il ligando perché lo stato conformazionale dell'integrina è a bassa affinità per il ligando

Quando il leucocita che rotola incontra il fattore chemiotattico allora si attiva l'integrina con un cambiamento conformazionale che la fa passare da bassa ad alta affinità.

C'è un aumento della affinità (favorisce il riconoscimento) ed anche un aumento della avidità (favorisce un **clustering** delle integrine nella zona della membrana dove devono poi riconoscere i ligandi, raggruppandosi –aumenta la valenza).

Sono meccanismi intracellulari ad aumentare l'attivazione delle integrine da parte di fattori chemiotattici: I recettori per fattori chemiotattici attivano segnali intracellulari che mediati da aumento di calcio e altri segnali di trasduzione convergono all'attivazione della G-protein RAP-1.

Negli ultimi anni si stanno conoscendo i meccanismi di regolazione dell'attivazione delle integrine tramite recettori che attraversano la membrana 7 volte in grado di attivare segnali di trasduzione molto specifici e che si possono modulare e appartengono alla famiglia delle G-protein couple receptors-GPCRS e attivano APOA a livello dei leucociti: i meccanismi di attivazione sono controbilanciati da altri segnali .

A livello dei leucociti ci sono altri recettori non tutti ancora identificati che riconosco fattori prodotti dai leucociti stessi o dalla cellule endoteliali che inibiscono la attivazione andando a bloccare RAP1 tramite la molecola GEF15 (?)che inibisce APOA

Questi fattori chemiotattici che attivano le integrine sono i medesimi responsabili della chemiotassi (movimento) dei leucotici:

Chemochine e altre molecole derivate dal metabolismo dei fosfolipidi come i **metaboliti dell'acido arachidonico** :

Per attivazione della fosfolipasi A2 che idrolizza i fosfolipidi di memebrana si libera acido arachidonico e questo a seconda del tipo cellulare può essere metabolizzato da categorie di enzimi diversi ciascuno dei quali ha mediatori diversi.

Uno di questi enzimi è la lipoissigenasi attraverso la quale originano i leucotrieni tra i quali il LTB4 che rappresenta un potentissimo fattore chemiotattico ma che anche è in grado di localizzarsi sulla superficie cellulare e come le chemochine ad azione specifica, attiva le integrine.

Un altro fattore chemiotattico importante è il PAF(platelet activating factor): anch' esso deriva dai fosfolipidi di membrana per azione della fosfolipasi 2 che libera acido arachidonico e il rimanente lisofosfolipide metabolizzato diventa PAF: il PAF19 attiva le piastrine ma fa anche altre cose tra cui attivare le integrine, vedi figura.

Schema riassuntivo:

Tethering e rolling tramite selectine porta all'adesione ferma che avviene esclusivamente se si attivano le integrine a livello del leucocita.

L'attivazione delle integrine è mediata da fattori chemiotattici (a livello della superficie delle cellule endoteliale) che agiscono sulle G-protein linked receptor che attivano una cascata di trasduzione intracellulare mediata da diverse vie, che convergono alla fine alla Rap-1 e quindi capace di attivare le integrine permettendo loro di interagire con vari ligandi espressi sula superficie delle cellule endoteliali.

Questo processo porta all'adesione ferma.

Attivazione delle integrnie:

- Si verifica durante il rolling e consiste nell'attivazione dei leucociti che diventano capaci di adesione

stabile.

L'attivazione consiste nel rendere le integrine atte al legame con il ligando specifico e, talvolta, nell'aumentarne l'espressione quantitativa. L'attivazione delle integrine è accompagnata dal distacco delle selectine dalla superficie dei leucociti.

- Durante questa fase anche gli endoteli si preparano all'adesione stabile aumentando l'espressione delle molecole appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline, molecole necessarie al legame con le integrine.

L'espressione delle immunoglobuline (specie della ICAM-1) viene attivata da TNF,

IL-l, IL-4, IFNγ, trombina, istamina, H_2O_2, leucotriene B4, chinine (mediatori pro-infiamatori).

Vedi grafico esplicativo la cinetica di espressione di molecole di adesione da parte di cellule endoteliali attivate da citochine:

In seguito dell'attivazione dell'endotelio abbiamo un'attivazione rapida delle P-selectine e una espressione più lenta di altre molecole di adesione come E-selectine e ICAM 1 e VCAM 1 che aumenta lentamente e poi rimane stabile.

Osservando cinetica di attivazione dei leucociti si può notare che la cinetica di espressione di queste molecole di adesione coincide con la fuoriuscita dei vari tipi di leucociti (i neutrofili escono prima rispetto ai monociti , dopo i linfociti).

Esiste un codice che comprende l’induzione delle selectine, molecole di espressione e fattori chemiotattici che combinato induce la migrazione di un tipo cellulare rispetto a un altro e questo codice cambia nel tempo: in successione per i neutrofili, poi monociti e infine linfociti.

Il codice diventa diverso ogni volta che c’è un agente eziologico specifico perché ogni agente eziologico induce la produzione di un pattern di mediatori specifici in grado di attivare un pattern di chemochine, fattori chemiottatici e molecole di adesione che indirizzano il reclutamento di un leucocita rispetto a un altro.

Figura che evidenzia cosa accade a livello di una cellula endoteliale: dalla cellula endoteliale resting, non stimolata, fino a una cellula endoteliale attivata da citochine con tutti i livelli di espressione delle molecole di adesione.

La PECAM 1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1) è una molecole di adesione che regola la diapedesi.

Le selectine che normalmente non vengono espresse, in seguito a stimolazione sono espresse e regolano il legame con i leucociti che hanno il controrecettore corrispondente.

Immagini al microscopio elettronico di leucociti, neutrofili, che cominciano ad aderire alla cellula endoteliale con un fenomeno che si chiama **Spreading** (spiacciamento alla superficie).

Adesione stabile:

- Le integrine dei leucociti coinvolte nella adesione sono principalmente due β2 integrine, CD11a/CD18

(LFA-1/αLβ2) e CD11b/CD18 (MAC-1/CR3/αMβ2), e una β1 integrina [VLA4 = very late antigen (α4/β

1)].

- Le immunoglobuline dell'endotelio principalmente coinvolte nell'adesione sono: ICAM-1, ICAM-2, e

VCAM-1.

Le interazioni adesive tra integrine e immunoglobuline avvengono con la seguente specificità:

- CD11a/CD18 leucocitaria con ICAM 1 e ICAM 2 endoteliali

- CD11b/CD18 leucocitaria con ICAM 1 endoteliale

- VLA4 leucocitaria con VCAM 1 endoteliale

Queste coppie di molecole di adesione possono essere espresse in maniera differenziale dei leucociti e ciò aiuta a comprendere la migrazione differenziale.

- Le integrine interagiscono anche con molecole della matrice connettivale tipo fibronectina, laminina,

con il collagene, con il fibrinogeno e con il fattore complementare C3b.

- I leucociti possono essere stimolati a rilasciare sostanze e modulati nella loro vitalità

Immagini che fanno vedere alcuni monociti che rotolano. E alcuni linfociti non polarizzati e un linfocita che inizia ad aderire.

Alcuni **inibitori** sono in grado di modulare il fenomeno della adesione o anche inibirlo dato che ad un certo punto la migrazione deve terminare quando il processo è arrivato alla fine.

Quindi esiste un'influenza negativa sulle varie fasi della migrazione dei leucociti.

GF1(NDR) blocca l attivazione delle integrine mediata da fattori chemiotattici

il rolling è bloccato dalla PTX3 (pentraxin 3) (che funge anche da proteina della fase acuta): proteina contenuta nei granuli dei granulociti neutrofili in grande quantità da cui può essere rilasciata a seguito di stimolazione oppure può essere prodotta da altre cellule

Bel 1 che blocca la adesione ferma.

TRASMIGRAZIONE - DIAPEDESI

Immagine delle varie tappe che regolano il reclutamento dei leucociti a livello delle venule: rolling, attivazione integrine con modificazione conformazione, adesione ferma mediata da ICAM, infine la fase di fuoriuscita e **trasmigrazione** dal sangue del leucocita o diapedesi: questa fase è quasi automatica una volta che avviene la adesione.

È mediata da **PECAM 1**(CD31) espressa costitutivamente sia dai monociti che dalle cellule endoteliali.

Ora sono conosciute altre molecole che partecipano al fenomeno come **JAM 1** e **caderine.**

L'espressione di queste molecole può essere modulate da mediatori pro-infiammatori (TNF, IL-1 etc) in relazione a causa eziologica e distretti di infiammazione etc..

La diapedesi si credeva avvenisse grazie al fatto che il leucocita si insinuasse nelle giunture tra le cellule endoteliali (formazione di psueudopodo), forzando la giunzione grazie a molecole di adesione e che durante il passaggio si attivasse producendo molecole favorenti questo processo.

Ora si è capito non si tratta solo di attivazione **paracellulare** a livello del leucocita, ma che esiste anche una via **transcellulare** , sempre mediata dalle molecole di adesione, che agisce a livello della cellula endoteliale stessa creando un canele, avvolgendo il leucocita e favorendone il passaggio.

Nella via transcellulare avvengono riarrangiamenti del citoscheletro all’interno della cellula endoteliale.

- L'adesione stabile mediata dalle integrine porta ad una “eccitazione” del leucocita con meccanismi di trasduzione che coinvolgono citoscheletro, attivazione di tirosin chinasi con fosforilazione di proteine in tirosina, produzione di radicali liberi dell'ossigeno per attivazione della NADPH ossidasi, e secrezione di enzimi e di altre molecole biologicamente attive e ad azione proinfiammatoria.

- Questo stato di attivazione è essenziale per la migrazione. Esso provoca l'appiattimento del leucocita sulla superficie endoteliale (spreading), l'emissione di pseudopodi e lo scivolamento verso le giunzioni.â€¨Arrivato in corrispondenza delle giunzioni tra le cellule endoteliali, il leucocita inizia l'attraversamento della parete vasale.

- Lo stato di attivazione del leucocita, prodotto dalla adesione mediata da integrine, è inoltre responsabile del distacco del legame integrine-immunoglobuline (probabilmemte attraverso l'aumento del calcio intracellulare), che è essenziale per consentire il movimemto del leucocita attraverso la parete vasale. L'aumento del calcio intracellulare favorisce anche la funzione dell'apparato contrattile cellulare e il movimento.

- La trasmigrazione attraverso la parete vasale è favorita dalla presenza sulle superfici della giunzione di una immunoglobulina (PECAM-l). Questo PECAM-l legando uno specifico recettore sul leucocita funziona come "guida molecolare" per il passaggio e per il movimento. Il passaggio è inoltre favorito dal fatto che il legame del PECAM attiva l'endoteliocita provocandone l'aumento del calcio intracellulare, la contrazione e quindi l'allargamento delle giunzioni.

- Il passaggio attraverso la parete è facilitato anche dalla secrezione di enzimi litici sul fronte del leucocita che avanza nella giunzione, e dall'aggancio a molecole della membrana basale (procollageno, collageno, laminina, ecc).

Schema aggiornato sulla cascata della fuoriuscita dei leucociti con le varie fasi e le molecole di adesione e proteine implicate nel segnale di trasduzione.

L’arresto del leucocita sulle cellule endoteliale attivato da fattori chemiotattici segua a un rotolamento lento. Continua con lo Spreading o adesione con attivazione delle varie molecole intracellulari a cui segue la diapedesi attraverso una via paracellulare o transcellulare con le rispettive molecole di adesione attivate.

Immagine che esplica il concetto di codice per un neutrofilo segnalando le molecole che posso essere espresse dal neutrofilo: selectina L, mucine (PSGL 1 e ESL 1), integrina beta 2 CD11/18, integrina beta 1.

Queste molecole espresse dal neutrofilo e i ligandi espressi dalla cellule endoteliali rappresentano l’inizio di un codice che favorirà la fuoriuscità dei neutrofli rispetto a quella degli eosinofili.

Ciascuna cellula esprime un pattern di molecole di adesione e predispone di un certo numero di fattori chemiotattici che in combinazione con l’espressione regolata di molecole di adesione sulle cellule endoteliali che fa si che in quel momento fuoriesca una cellula e non un'altra.

È un codice che cambia nel tempo: nel tempo si avrà una migrazione differenziale e sequenziale dei leucociti dal sangue che spiega la patogenesi, la flogosi acuta, la flogosi cronica e eventi conseguenti.

PROVE DEL RUOLO DELLE MOLECOLE DI ADESIONE

1. inibizione di legame con ligandi specifici in modelli in vitro:

usando piccoli peptidi o farmaci o anticorpi mimando in vitro sperimentalmente il fenomeno della migrazione e modularlo

2. inibizione della migrazione usando anticorpi monoclonali in modelli sperimentali in vivi:

ci sono moltissimi modelli sperimentali che mimano le patologie umane (soprattutto nel topo) e si dispone di molti anticorpi specifici contro determinate molecole di adesione o zone specifiche di una molecole di adesione che si possono iniettare nell'animale e vedere in quel determinato modello cosa accade, comprendendo quale è la cellula la cui migrazione viene inibita se viene usato quel determinato anticorpo contro quella determinata molecola in quel determinato modello sperimentale.

Microscopia intravitale con cui si può visualizzare in un animale anestetizzato in cui viene indotta la patologia secondo un modello sperimentale specifico, il tessuto isolato (intestino, cervello) quel che accade a livello di flusso, adesione, fuoriuscita dei linfociti etc.. e osservare dal vivo il ruolo di queste molecole.

3. topi K.O.:

topi geneticamente modificati in cui viene deleto un gene specifico che quindi mostrerà o no una modificazione utilizzando modelli sperimentali a confronto per diverse patologie.

Ci sono Topi singoli K.O. oppure doppi K.O., per selectine o per integrine

es in un topo knock out CD11/CD18 mancherà la migrazione dei leucociti e quindi le cellule si accumuleranno all'interno dei vasi .

4. malattie ereditarie (LAD): LAD1, LAD2 e LAD3

Esistono patologie genetiche umane che sono esempi chiave per illustrare il ruolo delle molecole di cui fin ora trattato. Fino ad oggi conosciamo tre Leukocyte Adhesion Deficenty: type 1, 2,3.

Deficenze genetiche che colpiscono alcune di queste molecole.

LAD-1 è una patologia legata ad una mancata espressione della catena beta 2 delle integrine quindi mancano tutte le integrine beta 2. Manca la fase dello sticking.

Soggetti affetti da tale patologia decedono in età precoce in quanto suscettibili a gravissime infezioni con seguito di serie complicazioni.

LAD 2 è la piu grave. Comporta la deficienza di uno dei liganti delle P selectine impedendo cosi che ci sia la fase Rolling.

LAD-3 comporta una mancanza genetica della proteina Kindlin 3 implicata nell'attivazione delle integrine.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 19/11/2012

PATOLOGIA GENERALE

CASSATELLA, 19/11/2012

Matteo Morandi

Ancora l'ennesimo schemino che riepiloga quello che abbiamo visto la volta scorsa , per la migrazione dei leucociti che dovete sapere bene. Mostra l'immagine del leucocita che si muove nel sangue: quando c'è uno stimolo infiammatorio stimola dei sensori sulle cellule che producono dei mediatori che favorisce la vasodilatazione il che spiega il fenomeno dell'edema essudatizio, poiché fa uscire una concentrazione di proteine paragonabile alla concentrazione che si trovano nel sangue. (nell'edema flogistico si associa un aumento della permeabilità che fa uscire le proteine dal sangue dai tessuti).

I mediatori innescano la reazione vascolare e la migrazione dei leucociti, che vanno a modificare la parete endoteliale, facendo ridurre o aumentare tutta quella seria di molecole di adesione che sono responsabile del richiamo, dell'aggancio, dell'adesione, della fuoriuscita dei leucociti dal sangue ai tessuti. Tra rotolamento e adesione ferma troviamo l'attivazione delle integrine. C'è un altro livello di regolazione che intercorre tra il momento in cui il leucocita esce dal vaso e si porta nella membrana basale, che è stato scoperto negli ultimi mesi.

La tabella riporta le principali molecole di adesione coinvolte nei processi di adesione: le selectine, importanti per il rolling, e i ligandi delle selectine (espresse una sui leucociti le altre sulle cellule endoteliali). Le integrine con i loro ligandi appartengono alla superfamiglia delle immunoglobuline (?2 e alcune delle ?1). Parlavamo delle prove che dimostrano l'importanza di queste molecole nella fuoriuscita dei leucociti dai vasi ai tessuti.

Ci sono **patologie** rare che sono LAD, "difetti di adesione da parte dei leucociti", sono molti gravi perché impediscono il reclutamento leucocitario dell'immunità innata o anche di quella specifica, questi difetti possono estendersi anche ad altre cellule.

LAD 1, la più frequente delle altre, con deficienza totale, ma ci sono anche casi con deficienza parziale, delle ?2.

LAD 2 mancanza di una selectina con difetti di rolling .

La terza conosciuta, ma che a livello molecolare è stata riconosciuta soltanto pochi anni fa, è dovuta alla mancanza di una proteina atta all'attivazione delle proteine, di conseguenza mancanza di adesione (KINDLIN3) è una proteina che si localizza a livello del citoscheletro e di tutto l'apparato legato alle integrine, una volta attiva stabilizza le integrine attivate dai recettori per fattori chemotattici GPCR (G protein capture receptors).

Il quadro clinico si mostra con una forte leucocitosi (aumento numero leucociti nel sangue), poiché i leucociti non possono migrare e quindi si accumulano nel sangue. [Abbiamo poi] Infezioni batteriche localizzate persistenti, quindi le infezioni di questi pazienti sono simili a quei pazienti con neutropenia. Dal punto di vista clinico abbiamo in queste patologie infezioni ricorrenti molto gravi, alla pelle. Tra i parametri di laboratorio una leucocitosi e soprattutto una neutrofilia.

A seconda del tipo di LAD avremo mancanza di un particolare CD (LAD 1 CD18, che corrisponde a β_2) mentre gli altri sono ancora presenti.

Abbiamo anche una neutrofilia. Nel caso del tipo 2 CDX sarà assente.

Nella LAD 3 si ha anche un interessamento delle piastrine, con una serie di patologie che riguardano le piastrine.

Le prostacicline, i derivati dell'acido arachidonico, fattori che aumentano l'AMPciclico, cortisonici, lipossine, antiinfiammatori sono molecole che inibiscono l'adesione. Possono essere utilizzati in terapia anticorpi monoclonali contro le varie molecole di adesione (ed addirittura epitopi diversi della stessa molecola) che servono per modulare la funzione di queste molecole, essi però sviluppano degli effetti collaterali pesanti.

Si puo pensare anche di utilizzare piccoli peptidi inibitori che competino con le molecole.

Extravasation, la fuoriuscita del linfocita che è stato attivato perché sta interagento con tutte le molecole di adesione e mandano dei segnali nella cellula che possono più o meno attivarlo, ad esempio producendo dei radicali dell'ossigeno o liberando i prodotti nei granuli e producendo mediatori, a basso livello, ovviamente, per non risultare tossico. Queste sostanze aiutano a forzare il passaggio, lo stato viene mantenuto nell'adesione e poi interagisce con le molecole della matrice. La condizione di attivazione permette al leucocita di rispondere a fattori dimetallici prodotti a seguito di danno tissutale o dai batteri stessi come fattore del complemento ecc.

La risposta a questi fattori corrisponde a movimento chemiotattico, che viene percepita come un gradiente.

(VIDEO, http://www.youtube.com/watch?v=ZUUfdP87Ssg o http://www.youtube.com/watch?v=YyQfIVJ5MGI)

Chemiotassi

la chemiotassi è il movimento di una cellula lungo un gradiente di concentrazione, non riguarda solo i leucociti, ma anche le cellule tumorali.

I batteri sarebbero capaci di misurare nel tempo diverse concentrazione e si muovono verso la zona in quel momento di maggior concentrazione (meccanismo temporale). I leucociti utilizzano uno spostamento spaziale per muoversi, verso la zona in cui la sostanza è maggiormente concentrata. Nei tessuti non esiste la chemiotassi ma il suo movimento è limitato dal fatto che la cellula si trova in una struttura tridimensionale e la sostanza chemiotattica si aggancia sulle cellule, fibre e matrice extracellulare. (aptotassi).

Quando un leucocita segue una scia chemiotattica, si estroflette in avanti e dietro emette una coda che spinge in avanti la cellula. (IMMAGINE)

Altra teoria è che si abbia la polarizzazione dei recettori che si trovano rivolti verso il lato con più alta percentuale di gradiente chemiotattico, i recettori vengono raggruppati e grazie a questo meccanismo si ha la formazione di uno pseudopodio/lamellipodio. Viene estesa la membrana cellulare e la cellula si attacca a un substrato per muoversi, la parte posteriore si contrae e dà una spinta posteriore alla cellula.

FMLP fattore chemiotattico che viene liberato da batteri Gram +,come stafilococco. FMLP è il prototipo dei fattori chemiotattici emessi dai batteri.

I neutrofili hanno all'interno della cella un pool di recettori pronti a migrare sulla membrana per incrementarne il numero presente sulla cellula, dando luogo al fenomeno della polarizzazione.

Se il fattore è distribuito uniformemente i leucociti, si distribuiranno un po' per parte.

La morfologia di una cellula cambia nel momento in cui si polarizza e migra, si forma questa struttura in avanti e sulla base di come si modifica abbiamo imparato a vedere cosa succede nelle varie parti della cellula (parte centrale, nella coda), anche da un punto di vista biochimico.

Conosciamo molto bene oggi i trasduttori che regolano la chemiotassi, un aumento del calcio intracellulare favorisce un riarrangiamento del citoscheletro, enzimi come la fosfatidilinositolo3chinasi che si presenta in varie isoforme alcune di queste sono cruciali in alcune cellule per mediare la chemiotassi. Sappiamo che in risposta a diversi fattori chemiotattici, per esempio IL8, l'FMLP... i recettori utilizzano una seria diversa di segnali di trasduzione per attivare la cellula. La chemiotassi è un fenomeno non solo per la fuoriuscita dei leucociti dai vasi ai tessuti ma è anche implicata in altri processi come il ricircolo dei linfociti e la loro concentrazione negli organi linfatici, gli stessi meccanismi sono utilizzati dalle cellule tumorali per dare metastasi. Probabilmente utilizzano molecole di adesione che agganciano i tessuti e favoriscono l'entrata tumorale in tessuti secondari (vedi lezione precedente).

(VIDEO) Questo si fa in vitro per identificare se una sostanza è chemiotattica.

Si può usare un vetrino, mettendo una goccia di cellule in sospensione da una parte e una sospensione di liquido di terreno di cultura, contenente la sostanza che crediamo chemiotattica, distante, si uniscono le due gocce e si vede se le cellule migrano lungo la congiungente che abbiamo creato, questo ci permette solo di dire se il leucocita si muove. Si può anche quantificare il fenomeno utilizzando delle camerette (camere di Bolt) in cui una membrana porosa con fori di vario diametro, a seconda del tipo di cellula che viene studiata, per i neutrofili ad esempio fori di 3 micron, perché possono variare molto dimensioni. Si separa sopra una sospensione di leucociti e sotto la sostanza chemiotattica in esame, dopo un determinato periodo si contano le cellule che sono migrate nel compartimento inferiore attraverso i pori. Anche sistemi automatizzati e commercializzati.

Un altro modo è studiarlo in vivo con il "modello della finestra cutanea", si può fare in volontari o in soggetti con patologie per individuare possibili difetti nella chemiotassi.

Si induce un'infiammazione locale molto lieve, con una scarificazione a livello dell'avambraccio, si mette una campanella e si immette 1ml di siero dello stesso paziente che produce un'infiammazione del derma. Si aspetta un giorno che si formi l'essudato, in questa cameretta, che dopo 24h sarà composto in un soggetto sano per il 95% da neutrofili, abbiamo scatenato un'infiammazione sterile localizzata. Si può analizzare il liquido, le cellule e i mediatori, studiando il processo infiammatorio o nel paziente malato, indagare un'eventuale deficit di chemiotassi coinvolto nella patogenesi.

Si conoscono tutta una serie di chemiotassine di origine batterica, come la formilmetionilleucinalanina(?) [esogene], lipidica (derivati dal metabolismo lipidico dei fosfolipidi delle cellule)come i leucotrieni, proteica(derivano dall'attivazione del complemento, citochine TGF-B) [endogene].

L'endotossina batterica è la più potente di tutte, nel confronto proiettato, ma non è direttamente chemiotattica, ma una volta iniettata attiva la produzione rapida di mediatori comprese le chemochine che attraggono i neutrofili. Il TNF induce chemiotassi indirettamente come IL1.

Chemochine

Le chemochine rappresentano una categoria i fattori chemotattici per eccellenza, il nome sta per "citochine chemio tattiche". Si definiscono citochine e hanno una potente funzione chemiotattica in quanto agiscono su recettori accoppiati alle proteine G trimeriche ; questi recettori hanno la caratteristica di attraversare 7 volte la membrana, in realtà tutti i fattori chemiotattici agiscono mediante questi recettori accoppiati ai recettori G.

Le chemochine si caratterizzano dal punto di vista della struttura perché presentano lungo la loro sequenza 4 residui di cisteina conservati che definiscono la chemokine scaffold (impalcatura delle chemochine).

Questa caratteristica venne identificata con le prime chemochine. In base a questa scaffold si possono individuare 4 sottoclassi di chemochine:

1. chemokines C - solo 2 conosciute
2. CX_3C - questa è una chemochina legata alla membrana, non solubile come le altre, ma può essere clivata e rilasciata come le altre. Un solo membro.
3. CC chemokines
4. CXC chemokines

La struttura secondaria è molto simile, con domini a foglietto ? ripiegati e a livello del residuo carbossiterminale abbiamo 2 domini ad alfa elica.

Le chemochine hanno la capacità (tra le varie) di indurre il reclutamento dei linfociti, per ogni tipo di leucocita conosciamo le varie chemochine capaci di agire su queste cellule, è un sistema molto ridondante.

La classificazione in gruppi ci aiuta a ricordare la loro capacità chemiotattica.

Sono conosciute 50 chemochine (dovete conoscere non solo il nome originale ma anche la nomenclatura attualmente usata) si parla di chemochine della famiglia di CXC, conosciute come CXCL, L sta per ligando e sono 16, i recettori di queste si chiamano CXCR, R sta per receptor. Nella famiglia delle CXC comprende tutte le chemochine che sono in grado di reclutare i granulociti neutrofili, il prototipo di questa famiglia è la CXCL8, ovvero IL8. Eccezione fanno CXCL 9, 10, 11 (ovvero Mig, IP-10, I-TAC) che legano tutte il recettore CXC3B e sono fondamentali nell'attivazione del linfociti TH1. [Le chemochine hanno peso molecolare molto basso, nell'ordine di 8-10 kDa]

CXCL13 recluta i linfociti B.

Ci sono poi 28 CC chemokines (CCL1-CCL28) queste reclutano non reclutano i macrofagi, ma gli altri tipi cellulari, neutrofili, cellule NK, linfociti T, dendritiche… il capostipite è MCP1 (monocite chemitatik protein 1) CCL2. [imparatevi la tabella!)

L'Eutassina è una chemochina specializzata nel reclutare gli eosinofili.

CX_3C chemokines rappresentata solo dalla fractalina.

Per le C chemochine abbiamo la linfocaptina che attiva cellule T ed NK.

Per ogni tipo di cellula ci sono tante chemochine: per esempio le cellule dendritiche rispondono alle chemochine della famiglia CC, i neutrofili sono reclutati dalla famiglia CXC, cellule NK da CC e/o CX3C, eosinofili dall'eutassina.

Possiamo suddividere le chemochine anche in quelle prodotte costitutivamente da parte di alcuni tessuti e quelle che sono inducibili, prodotte solo durante una risposta infiammatoria o una situazione di danno.

Le chemochine costitutive regolano il traffico leucocitario normale, soprattutto il traffico dei naive T e B, che ricircolano continuamente nel sangue e negli organi linfoidi anche in assenza di situazione di pericolo, quindi serve un intero sistema di regolazione e di controllo del ricircolo.

I recettori sono pochi rispetto alle chemochine poiché ogni recettore ne lega più di una. CCR1 CCR2 CCR3 CCR4 condizionano il reclutamento delle cellule mononucleate dei tessuti. (Rispondono a tutte le citochine CCL). Risposta di tipo TH1 in caso di infiammazione.

La risposta immunitaria aspecifica di tipo TH2 si monta in caso d'infezione parassitaria, facendo sì che si attivino i linfociti TH2 che richiamano gli eosinofili, effettori della risposta contro i parassiti.

Tutte queste risposte orientate sono modulate dalle chemochine.

Alcuni recettori legano una solo chemochina mentre altri sono molto più promiscui, complicando il problema, perchè sono anche molto specifiche. Vedi il topo knock out, dove la delezione di una chemochina è ininfluente perchè rimpiazzata dall'azione delle altre.

Non sono le chemochine ma i recettori che condizionano la risposta, ci sono anche dei recettori sulle cellule che non segnalano, legano le chemochine (tante) sequestrandole dall'ambiente spegnendo il sistema.

Esistono anche alcuni recettori per chemochine che sono espressi da virus; gli agenti patogeni con cui il sistema immune combatte, si difendono in modo da evadere la risposta immunitaria.

Molti virus (Sarcoma di Kaposi ed altri) codificano per molecole che assomigliano a recettori per chemochine in modo da impedirle di svolgere la loro funzione e di reclutare i leucociti, questo è uno dei tanti meccanismi di evasione dei patogeni.

Questo sistema di chemochine è un sistema che funziona **regolato** e che dipende da una serie di eventi che riguardano l'agonista, ovvero la chemochina stessa, (produzione e processamento) abbiamo molti esempi di chemochine che vengono prodotte in seguito a stimolo processate e rilasciate nell'ambiente extracellulare e qui essere attivate oppure modificate per essere inattivate; e dal recettore espresso dalla cellula bersaglio e dal signaling che questo recettore sarà in grado di attivare o meno (recettori muti). Le chemochine vengono quindi prodotte solo il tempo necessario per funzionare.

C'è un ulteriore livello di regolazione, quindi è l'espressione dei recettori detta se una determinata cellula risponderà o meno allo stimolo, ma noi sappiamo che i recettori possono cambiare nel tempo, in base all'ambiente in cui è posta la cellula: per esempio i linfociti T inattivi (figura) esprimono determinati recettori che mutano nel momento che intraprende la strada di linfocita TH2, che risponderà quindi ad un pattern di citochine diverse rispetto alla propria fase di riposo.

Per spiegare il fenomeno della **ridondanza** si sono date due spiegazioni:

la prima ci mostra come alla mancanza, per un qualsiasi motivo di una chemochina, lo stesso compito può essere svolto da una chemochina con target equivalente.

La seconda spiegazione dice che durante fasi differenti del reclutamento dei leucociti, per esempio dei neutrofili, all'inizio gioca un ruolo importante IL-1? che poi richiameranno nuove ondate di neutrofili portando ad una amplificazione dell'effetto delle chemochine. Mediatori diversi che hanno come bersaglio lo stesso tipo cellulare ma vengono attivate in momenti diversi in sequenza poiché con il sopraggiungere di nuove cellule l'ambiente cambia.

I recettori per chemochine possono essere utilizzati come marcatori di tipi cellulari, o meglio di sottotipi cellulari.

I linfociti TH1 e TH2 prima venivano discriminati solo e unicamente dalle citochine che erano in grado di produrre ora in base anche ai loro recettori.

TH1 produce l'interferone gamma, oggi possiamo distinguerli per la presenza di CCR3 e CCR5.

TH2 produce CCR3 e CCR4.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 20/11/2012

Professore: M. A. Cassatella

Sbobinatore: Matteo Morini

20/11/2012

(*I punti di domanda tra parentesi indicano il riferimento del professore ad una particolare immagine delle diapositive che non è stato possibile chiarire nella trascrizione dal momento che le slide non sono ancora state rese disponibili NdR*)

RECETTORI PER LE CHEMOCHINE

Stavamo parlando dei recettori per le chemochine e quindi dell'importanza di alcuni recettori come marcatori di cellule o meglio di sottotipi di cellule, soprattutto dei Th1 e dei Th2.

Questa diapositiva (???) illustra quelli che sono i circuiti che vengono innescati durante una risposta Th1, Th2 e Th17; questi mediatori orchestrano il reclutamento delle cellule e attivano le cellule a produrre altri mediatori che sono poi essenziali per l'eliminazione dell'antigene specifico nel caso delle risposte mediate da linfociti T-helper.

In quest'altro schema (???) si vede l'importanza delle chemochine e dei recettori per chemochine; si innesta una risposta Th2 attraverso una serie di eventi (presentazione antigene ecc..) e vengono polarizzati i linfociti Th2, che sono specializzati nel produrre mediatori specifici, come IL-13 e IL-4; quest'ultima prepara il terreno per eliminare i macroparassiti.

IL-4 non è una chemochina, non attrae direttamente i mediatori cellulari specifici della risposta Th2, ma va a stimolare le cellule bersaglio, come cellule epiteliali, endoteliali o macrofagi, a produrre una serie di chemochine (eotassina 1,2.3, ???) che alla fine vanno a richiamare le cellule effettrici della risposta Th2 quali eosinofili, cellule polimorfonucleate, basofili e altri tipi di cellule; questo perché gli eosinofili e i basofili hanno i recettori per queste chemochine. La stessa cosa vale per l'IFN-γ che dà la risposta Th1.

Il tipo di risposte che questa polarizzazione dei linfociti T helper 1 media sono risposte antivirali o più in generale cellulo-mediate, le quali servono a eliminare patogeni intracellulari come virus, batteri, micobatteri ecc… Mentre quelle Th2 sono risposte antiparassitarie e quelle Th17 mirano a eliminare gli agenti patogeni extracellulari (batteri, cocchi,…).

Abbiamo visto come marcatori-recettori CCR5 e CCR3; CCR3 è un recettore per le chemochine che sta aiutando moltissimo a marcare questi linfociti polarizzati, CCR5 invece è un recettore per linfociti B. Questi recettori per chemochine possono servire, in combinazione con altre molecole di superficie, come marcatori.

Le chemochine non hanno solo attività chemiotattica, ma insieme ad altri fattori chemiotattici sono implicate anche nell'aiutare la migrazione dei leucociti dal sangue ai tessuti, attivando le integrine (es. IL-8) e favorendo il processo dell'adesione ferma; CX3CL1, cioè la fractalkina, è attaccata all'endotelio e può favorire direttamente l'adesione e poi la migrazione nel tessuto.

Poi c'è un'altra azione biologica molto importante: le chemochine, una volta che il leucocita arriva dove deve arrivare, possono direttamente stimolare la cellula e alcune sue risposte rapide; per esempio le chemochine che agiscono sui neutrofili possono anche direttamente stimolarli a rilasciare la **mieloperossidasi** o **l'elastasi**: favoriscono cioè la degranulazione, la secrezione extracellulare del contenuto dei granuli. Anche gli eosinofili possono essere stimolati a rilasciare i granuli con il loro contenuto; mastociti e basofili sono i maggiori produttori di **istamina** e le chemochine possono indurre la secrezione rapida di istamina.

Un'altra funzione dei fagociti (*credo che intendesse delle chemochine sui fagociti NdR*) è il **respiratory burst** ("esplosione respiratoria") che consiste nella stimolazione a far produrre a queste cellule radicali liberi dell'ossigeno, che sono molecole molto tossiche per i batteri; macrofagi, neutrofili, eosinofili, cellule dendritiche e monociti possono essere stimolati a produrli perché queste cellule hanno un enzima specializzato in questa funzione (N.B. "stimolazione" è diversa da "attivazione").

Un'altra azione importante esercitata dalle chemochine è la modulazione dell'**angiogenesi**, cioè possono favorire la produzione di nuovi vasi oppure inibirla. L'angiogenesi, cioè la formazione di nuovi vasi da quelli che sono già presenti, si differenzia dalla vasculogenesi, che è la formazione dei vasi durante lo sviluppo embrionale. Il processo dell'angiogenesi è importante durante la risposta flogistica nella fase di riparazione tissutale, in cui servono nuovi vasi.

Come fanno le chemochine ad avere un ruolo positivo nell'angiogenesi? Un'azione è diretta, nel senso che le chemochine possono direttamente agire sulle cellule endoteliali, poiché le cellule endoteliali possono avere dei recettori per chemochine, quindi stimolare le cellule endoteliali a muoversi e proliferare. Oppure c'è una seconda azione (*indiretta*) in cui le chemochine reclutano cellule leucocitarie e le stimolano in modo da indurne il rilascio di fattori pro-angiogenetici (tra cui **VEGF**, Vascular Endothelial Growth Factor, una delle sostanze più potenti per indurre l'angiogenesi).

Questa funzione delle chemochine gioca un ruolo molto importante nell'angiogenesi che avviene durante la crescita dei tumori, che sono costituiti da un accumulo di cellule che proliferano. Col tempo la massa tumorale si espande e si avvale della nutrizione portata dai vasi di quel tessuto fino a un certo punto, poi questa massa cresce tanto che la vascolatura preesistente non ce la fa a rifornire le sostanze nutritizie; quindi succede che il tumore si produce nuovi vasi, perché le cellule tumorali producono fattori angiogenetici oppure perché producono chemochine che reclutano i leucociti e dopo essere arrivati producono loro i fattori angiogenetici. Da qui la grande attenzione nel cercare di bloccare l'angiogenesi durante la crescita del tumore. È da tenere presente che una cellula tumorale ha molti recettori e produce tante chemochine e quindi va ad orchestrare il richiamo di cellule che può servire a stimolare la crescita neoplastica.

Ma ci sono anche chemochine ad azione inibitoria dell'angiogenesi, cioè angiostatiche.

Le chemochine della famiglia CXCL (1,2,3,5,6,7,8) sono le più potenti chemochine pro-angiogenetiche, che agiscono su CCR2 e CCR1 (neutrofili), e quelle angiostatiche fanno parte della stessa famiglia (CXCL). Tra queste chemochine che inibiscono l'angiogenesi sono incluse anche CXCL9, CXCL10, CXCL11 (hanno azione chemiotattica su linfociti Th1, che hanno un recettore CXCR3, e sono indotte dall'IFN-γ), che agiscono su una variante del recettore CXCR3, cioè CXCR3b (CXCR3a è espresso dai linfociti Th1, CXCR3b è espresso dalle cellule endoteliali). Quindi all'interno della famiglia CXCL esistono delle chemochine angiogenetiche ed angiostatiche: la spiegazione risiede in sequenze/motivi amminoacidiche differenti, nonostante un'omologia abbastanza conservata; per esempio le CXCL1,2,3,5,6,7,8 hanno la sequenza glucina-leucina-arginina, mentre le altre (CXCL9,10,11) non ce l'hanno, quindi questa sequenza è fondamentale per il diverso legame con il recettore sulle cellule endoteliali.

Poi, alcuni anni fa, è stata individuata un'altra azione importante delle chemochine: si è visto che alcune chemochine di alcuni tumori, per es. il tumore maligno della mammella, possono giocare un ruolo chiave nel processo della metastasi, cioè nel processo di formazione di un tumore secondario a distanza (i tumori maligni sono tali perché a differenza di quelli benigni danno metastasi).

Studiando la metastasi si è visto che ci sono degli organi che sono colpiti con una frequenza molto maggiore rispetto agli altri, indipendentemente dal tipo di tumore primario: polmone (dopo diagnosi di tumore maligno fare subito radiografia al polmone) e fegato. Ma ci sono dei tumori che oltre a metastatizzare questi due organi vanno a localizzarsi in sedi specifiche, o meglio vanno a metastatizzare con maggiore frequenza alcuni organi rispetto ad altri: si parla di "**metastasi preferenziale**", diversa da quella in polmoni e fegato perché in questi ultimi le cellule ci passano per forza e perché essi presentano un ambiente che favorisce l'attecchimento e la crescita.

Che cos'è che condiziona questa metastasi preferenziale? Dipende dal tipo di tumore, per es. le cellule del tumore della mammella vanno preferenzialmente al fegato, polmone, ossa; queste cellule esprimono dei recettori per chemochine specifiche che possono essere prodotte dall'organo che verrà colpito, quindi c'è un richiamo da parte di queste chemochine e le cellule tumorali che hanno i recettori vanno in quell'organo.

Il ruolo delle chemochine dei tumori è vario:

- può condizionare la metastasi preferenziale (CXCR12, CXCR21 e le cellule tumorali hanno CCR4, CCR7);

- possono modulare l'angiogenesi se il tumore produce chemochine pro-angiogenetiche o angiostatiche;

- sono implicate nel richiamo dei leucociti, che può avere un'azione benefica per l'ospite perché i leucociti si attivano ed eliminano le cellule tumorali, oppure un'azione che favorisce la crescita del tumore attraverso la produzione di chemochine pro-angiogenetiche.

Le chemochine possono partecipare alla differenziazione e proliferazione di alcuni tipi cellulari del midollo. Ci sono fattori che favoriscono la maturazione e la proliferazione dei leucociti e fattori che la bloccano, attraverso un'azione concertata. Le chemochine possono quindi modulare il processo della produzione di cellule dal midollo osseo. Poi si è visto, negli ultimi anni, che le chemochine possono modulare l'espressione genica.

In questa figura (???) sono illustrate alcune funzioni delle chemochine nel processo dell'**aterosclerosi**: possono esercitare effetti cellula-specifici, infatti nel topo questi sottotipi di monociti esprimono dei recettori specifici che possono influenzarne il richiamo in un determinato tessuto, es. nelle placche aterosclerotiche dei vasi. CXCR6 agisce prevalentemente sui linfociti T e questi sui monociti, così come sul reclutamento di cellule mononucleate che poi possono avere funzione aterogenica (l'aterosclerosi è il processo infiammatorio dettato dal richiamo soprattutto di monociti e macrofagi). Oggi sappiamo che in sedi diverse dello stesso organo si vanno a localizzare cellule diverse e questo richiamo dipende da recettori specifici espressi dalle cellule che vanno in quella determinata sede; durante lo sviluppo della lesione aterosclerotica può cambiare il pattern di recettori per chemochine che modula l'avanzamento della patologia (all'inizio CXCR5, nelle fasi avanzate un altro recettore), quindi bisogna dare farmaci che bloccano la molecola/recettore nella fase giusta. Inoltre non basta bloccare un recettore per una molecola perché ci sono più recettori che funzionano. Diversi recettori per chemochine hanno un ruolo diverso nella migrazione dei leucociti, nel caso dell'arresto di questi recettori, nel caso della migrazione altri (???). Ci sono chemochine ad azione protettiva che bloccano i neutrofili e i macrofagi.

Le chemochine si caratterizzano come tali all'interno di fattori chemiotattici in quanto agiscono su questa categoria di recettori, i 7 (???) transmembrane receptor, che attraversano sette volte le membrana e si accoppiano a proteine G eterotrimeriche (il recettore per FLMP, un peptide rilasciato dai batteri, appartiene a questa categoria). Questi GPCR (recettori accoppiati a proteine G) fanno parte di una famiglia che lega tanti agonisti, chemochine, mediatori neurologici, angiotensina ecc.. e mediano una serie di funzioni come la migrazione cellulare. Varie subunità Gα possono essere accoppiate a diversi recettori per fattori chemiotattici (CC5a, PAF, CCR4, …) e stimolano la via di trasduzione che porta al movimento cellulare. Questi recettori per fattori chemiotattici e chemochine innescano non solo il movimento ma anche una serie di risposte effettrici da parte della cellula stimolata dalla chemochina (assemblaggio citoscheletro, modulazione di espressione di molecole di adesione, induzione della degranulazione, burst respiratorio) attraverso l'aumento del $Ca2+$ intracellulare; poi anche altre azioni biologiche come il rilascio di acido arachidonico, rilascio di citochine, …

Quindi i recettori sono in grado di innescare diverse risposte biologiche da parte della cellula e il problema fondamentale è quello di capire quali sono le vie di trasduzione che sono responsabili di quella determinata risposta rispetto ad un'altra.

(*riferimenti a immagini delle slides, in cui il professore illustra alcuni pathway di trasduzione a partire da uno stesso recettore NdR)*

Un altro esempio e l'**IL-8** (oppure CCL8), che è una chemochina fondamentale per il reclutamento dei neutrofili, di cui si stanno cercando di inibire i recettori CCR1 e CCR2 per curare le patologie umane; quando lega CCR2 può attivare una serie di risposte biologiche come l'aumento del Ca2+ e quindi l'esocitosi, l'attivazione della produzione di radicali liberi dell'ossigeno, il rilascio e la produzione di mediatori di origine lipidica come LTB4 e Prostaglandina2. Tutto questo attraverso l'attivazione della fosfolipasi C-β (responsabile dell'aumento del calcio e di altre risposte), fosfolipasi D, fosfolipasi A2 (che è responsabile della produzione di radicali liberi e metaboliti di origine lipidica). Queste fosfolipasi possono essere bloccate da farmaci.

Gli "**Orphan receptors**" sono recettori di cui non conosciamo ancora il ligando, tra questi ci sono DARK, D6, CCX-CKR che sono silenti e in grado di legare molte chemochine ma non sono in grado di mandare un segnale intracellulare. Hanno quindi un'azione modulatoria negativa, servono probabilmente a togliere dall'ambiente le chemochine che hanno finito di funzionare, sono state inattivate,… Questi recettori silenti rientrano nella categoria dei "decoy receptors", che legano alcuni ligandi ma non sono in grado di segnalare o addirittura spengono il segnale e quindi funzionano da regolatori negativi; questi sono codificati da geni distinti dai recettori segnalanti. Spengono il segnale attraverso intrappolamento del ligando, sequestrazione ecc.. Per spegnere le risposte da chemochine ci sono anche altri meccanismi come la degradazione extracellulare delle chemochine.

<u>Ruolo delle chemochine nella patologia</u>:

Ci sono varie prove che dimostrano l'importanza di queste molecole nella patologia:

- KO mice -> es. KO per CCR2 dà difetto nel reclutamento dei neutrofili, per CCR3 difetto reclutamento degli eosinofili, per CCR1 formazione difettosa dei granulomi, per CCR7 difetto organogenesi organi linfoidi secondari, per CCR1 di NK reclutamento difettoso

- Knock-In mice -> es. modello di artrite in cui si dimostra il ruolo del CC5a, il gene del recettore per il CC5a umano viene transfettato, se viene dato un anticorpo specifico contro questo recettore la malattia si previene (ci sono vari farmaci che bloccano CC5a, usati in alcune malattie).

- Correlazione chemochine e infezioni da virus -> es. HIV lega CD4, espresso da linfociti T-helper, tramite Gp120 e poi CCR5 (corecettore, appartenente alla famiglia dei recettori per chemochine), che permette l'entrata nella cellula; quest' ipotesi è stata validata dall'osservazione di individui che pur venendo in contatto con il virus non sviluppavano la patologia, perché hanno mutazione nel CCR5. Questi ceppi di virus infettano l'individuo nelle fasi iniziali, poi man mano che il virus si sviluppa cambia utilizzo di corecettori; CCR5 e CXCR4 sono i corecettori più importanti che riconoscono rispettivamente ceppi M-tropici e T-tropici per HIV. Alcuni virus ancestralmente hanno incorporato i geni dell'ospite e quando infettano la cellula bersaglio esprimono questi geni, alcuni dei quali hanno forte omologia con i recettori per chemochine che fungono da decoy (legano chemochine che l'ospite produce per innescare una risposta immunitaria contro il virus); quindi il virus si difende con l'espressione di questi recettori

- Osservazioni correlative -> si conoscono le cellule implicate nella patogenesi di alcune malattie (ad es. sindrome respiratoria acuta, …), quindi si possono dimostrare quali sono le chemochine implicate nel reclutamento di queste cellule e ciò ci permette di bloccare queste chemochine o i recettori per esse e suddividere le malattie in tipo Th1, Th17, Th2 o a seconda dei recettori implicati. Oggi esistono farmaci che bloccano i recettori di malattie infiammatorie e tumori (patologie infiammatorie croniche del polmone, del colon, artrite reumatoide, asma, sclerosi multipla, aterosclerosi, psoriasi), già usati in clinica o nei trial.

<u>Preferenzialità della migrazione leucocitaria</u>

Nelle diverse patologie o fasi delle patologie come si spiega il reclutamento dei leucociti?

Con il **codice**/preferenzialità della migrazione (es. in un certo momento ci sono i neutrofili, in un'altra patologia solo eosinofili,…).

Nella classica infiammazione indotta da iniezione di glicogeno nell'animale a livello peritoneale, nel tempo, arrivano prima i granulociti, poi diminuiscono e cominciano a comparire le cellule mononucleate. I diversi tipi di leucociti migrano con una diversa sequenza temporale: in genere neutrofili, monociti e infine linfociti.

A seconda della causa, dell'organo interessato e del tipo di infiammazione ci può essere una prevalenza di un tipo leucocitario rispetto ad altri. I granulociti neutrofili appaiono come popolazione prevalente nella risposta infiammatoria acuta. Banalmente si potrebbe pensare che ciò avviene perché sono i più presenti nel sangue, in realtà il reclutamento è molto più regolato. Il reclutamento è dovuto all'attivazione di meccanismi molecolari diversi, dovuta al codice e precisamente:

- differenza del corredo di selectine e integrine presenti e attivate sulla membrana dei globuli bianchi e sulle superfici endoteliali: ci deve essere una combinazione concertata, per esempio indotta, di molecole di adesione sul leucocita e sulla cellula endoteliale, che deve essere contemporanea;

- presenza di differenti fattori chemiotattici (soprattutto chemochine);

- presenza di recettori specifici per differenti fattori chemiotattici.

Quindi il codice è composto dalla combinazione contemporanea della giusta selectina, della corretta integrina, dell'adeguato fattore attivante, del corretto ligando endoteliale e del fattore chemiotattico specifico per ogni tipo di leucocita. Il codice deve essere sempre completo, in assenza di uno di questi fattori il leucocita non fuoriesce.

Ad ogni componente del codice si può attribuire un numero (es. 321, codice dei neutrofili -> 300: E-selectina per Sle-X / 20: IL-8 / 1: ICAM-1 per β2).

Il codice varia nel tempo, per tessuto, per causa.

LINGUAGGIO DELL'INFIAMMAZIONE

I mediatori chimici costituiscono il linguaggio dell'infiammazione e sono derivati

1) dai sistemi polimolecolari solubili del plasma e dell'interstizio (sistema del complemento, delle chinine, della coagulazione)

2) da cellule durante il loro reclutamento (preformati, neoformati rapidamente, neoformati lentamente).

Funzioni cellulari coinvolte nell'infiammazione:

- regolazione del tono delle miocellule (influire sulla vasodilatazione)

- contrazione endoteliociti (favorire la pervietà dei vasi)

- secrezione di mediatori costitutivi (presenza costitutiva dei mediatori all'interno dei granuli, che possono essere rilasciati rapidamente e innescare risposte rapide)

- sintesi e rilascio di fattori biosintetizzati rapidamente o lentamente

- i mediatori possono influenzare il movimento delle cellule a random, cioè casuale, oppure con un movimento chemiotattico, indirizzato verso una sorgente lungo un gradiente di concentrazione

- adesione del leucocita all'endotelio

- aggregazione dei leucociti e delle piastrine

- fagocitosi (= un tipo di endocitosi per inglobare particelle grandi)

- priming (aumento della responsività potenziale: analogia con una cellula “drogata”; una cellula è sottoposta all’azione di determinati mediatori senza cambiamenti morfologici o funzionali; quando stimolata produce molte più molecole rispetto a una cellula non sottoposta a priming. Es. azione IFN-γ su macrofago o neutrofilo. Un neutrofilo che ha visto l’IFN-γ e viene stimolato dall’ FLMP, un fattore chemiotattico in grado di indurre la produzione e la secrezione di radicali liberi dell’ossigeno, produce una maggiore quantità di radicali

- differenziazione

Mediatori chimici derivati dai sistemi polimolecolari solubili

Caratteristiche:

- composti da famiglie di **proenzimi** (stato inattivo, in genere quando si attivano acquisiscono attività protesica)

- **attivazione sequenziale** dei componenti (attivazione a cascata con taglio proteolitico)

- **liberazione di molecole biologicamente attive** (A taglia B, B diventa biologicamente attivo e il pezzettino tagliato può svolgere a sua volta attività biologica, quindi in seguito alla cascata si ha attivazione diretta dei componenti con formazione di prodotti di degradazione che possono avere attività biologica)

- **poliattivabilità** (una proteasi di un sistema può attivare i componenti di un altro sistema; i vari sistemi sono intersecati, si ha una fortissima integrazione tra i vari sistemi)

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 21/11/2012

21/11/2012

Pizzo Vera

Prof. Berton

Lezione 9: danni da iperglicemia

Dopo aver parlato di diabete di tipo II e insulino-resistenza sarebbe logico dedicare un po' di spazio ai **danni da iperglicemia**, cioè come mai l'iperglicemia prolungata determina una serie di danni nel nostro organismo, che vanno compresi nei meccanismi di glucotossicità. L'aumento prolungato del glucosio, sia nel distretto vascolare, sia nelle cellule in cui il trasporto del glucosio non è regolato, dove quindi in condizioni di iperglicemia abbiamo un ingresso di glucosio maggiore attraverso i trasportatori del glucosio costitutivamente espressi, determina importantissime patologie; queste patologie sono tra l'altro oggetto di approcci terapeutici indipendenti dall'eliminazione delle cause (cioè dell' iperglicemia e del diabete). Sono tutte complicazioni molto gravi, soprattutto nei soggetti anziani e con un diabete di tipo 2 prolungato nel tempo, come le retinopatie che possono portare alla cecità, o alterazioni cerebro-vascolari. (*diapositiva 2 e 4 lezione 9*). Il diabete è strettamente correlato ad un'aumentata incidenza di infarti del miocardio dovuti a lesioni aterosclerotiche; l' aumentata incidenza di lesioni aterosclerotiche è responsabile degli accidenti cerebro-vascolari. Un altro distretto tipico di danno è rappresentato dal distretto glomerulo-renale, vi sono alterazioni

glomerulari che portano allo sviluppo di nefropatie ed insufficienza renale, quindi incapacità di filtrare una quota sufficiente di urina attraverso i glomeruli.

C'è poi tutta una serie di alterazioni del sistema autonomo che comportano, per esempio, alterazioni della peristalsi intestinale, impotenza, anche in questo caso per danni al microcircolo. Malattie dei vasi periferici che portano a complicanze che possono essere rappresentate da necrosi (e che quindi possono determinare amputazione di arti) o neuropatie periferiche molto dolorose e con perdita della sensibilità.

Quindi è una patologia molto complessa a cui i medici in generale, sia internisti che specialisti diabetologi, dedicano molta attenzione perché è una patologia grave e per questo motivo è importante studiare in dettaglio quali siano i meccanismi responsabili di questi danni.

Sostanzialmente queste alterazioni sono dovute alla prolungata iperglicemia, secondariamente all'accumulo di una serie di danni in diversi tessuti e sono ovviamente aggravate dalla concomitanza di altri fattori, come per esempio l'ipertensione, alterazioni del metabolismo lipidico…

Uno dei distretti importanti (soggetto a glucotossicità) è rappresentato dal **distretto vascolare**: l'iperglicemia determina dei danni alle cellule endoteliali sia nei vasi del microcircolo, quindi questo spiega i danni *(incomprensibile)* del glomerulo e dei nervi periferici, sia nelle arterie di medio e grosso calibro e questo stabilisce una relazione tra iperglicemia e aterosclerosi. Tutti questi danni convergono in una serie stereotipata di alterazioni che sono sostanzialmente:

1. un inspessimento dell'intima e in alcuni casi della media vascolare con un maggior deposito di matrice extracellulare e alterazione dell'elasticità

2. un aumento della permeabilità, quindi accumulo di liquido nel sottoendotelio

3. fenomeni di vasospasmo accoppiati a queste alterazioni qui descritte

4. sviluppo di danno endoteliale con fenomeni di adesione leucocitaria e di aggregazione piastrinica che portano a fenomeni di microtrombosi e quindi di necrosi delle zone di tessuto irrorate da questi distretti micro circolatori

Vi sono **4 vie metaboliche** fondamentali che sono **responsabili della glucotossicità** (*diapositiva 5 lezione 9*) nei confronti delle quali si registrano anche dei farmaci in grado di alterare almeno parzialmente queste vie:

1. aumentata formazione di sorbitolo e fruttosio mediata da aldosio reduttasi

2. il glucosio determina una modificazione delle proteine, nel senso che l'iperglicemia prolungata determina un fenomeno di glicazione, cioè di attacco di residui di glucosio a molecole proteiche, venendo a costituire quelli che vengono chiamati AGE (advanced glycation end-products). Queste proteine modificate si trovano dappertutto, sono proteine per esempio della matrice extracellulare che alterano quindi alcune proprietà dei connettivi sottoendoteliali, come l'elasticità. Sono anche proteine intracellulari e quindi vi sono fenomeni di glicazione, per esempio, di fattori di trascrizione o altre molecole. Quindi questo è un campo complesso: esiste una relazione diretta tra infiammazione e riconoscimento di queste molecole, per cui cellule della difesa innata, in particolare le cellule monocitarie e macrofagiche, hanno degli AGE-receptors, cioè hanno dei recettori per questi AGE, e l'interazione con le cellule delle difese innate costituisce quello che è il braccio infiammatorio del danno al microcircolo. Le cellule delle difese innate riconoscendo queste proteine glicate vengono attivate a produrre una serie di citochine che sono responsabili di un danno infiammatorio

3. aumentata produzione di diacilglicerolo e attivazione di protein chinasi C

4. aumento della via di formazione dei esosamina

Lezione 10: recettori accoppiati a proteine G trimeriche

Affronteremo due meccanismi di trasduzione del segnale con relativi aspetti patologici e fisiopatologici, che sono rappresentati da:

1. una classe particolare di recettori, ovvero i **recettori accoppiati alle proteine G trimeriche**

2. un gruppo eterogeneo di recettori che sono **recettori catalitici** che però non hanno un dominio intracitoplasmatico ad attività enzimatica ma legano degli enzimi citoplasmatici e l'unità recettore-enzima citoplasmatico associato costituisce un analogo dei recettori per i fattori di crescita, cioè un vero e proprio recettore catalitico.

I **recettori accoppiati a proteine G trimeriche** sono recettori molto caratterizzati, che hanno tutti una struttura simile. Sono chiamati in vario modo, seven-transmembrane-spanning receptors,recettori a serpentina. (*diapositiva 2 lezione 10)* Hanno 7 domini idrofobici che attraversano la membrana citoplasmatica, hanno una lunga coda citoplasmatica che è la sede di interazione con queste proteine G trimeriche e non solo, è infatti anche la sede di una serie di eventi di modificazione post-traduzionale che sono sostanzialmente degli eventi di fosforilazione; infatti diverse protein chinasi, sono tutte serin-treonin chinasi o del gruppo delle PKA e delle PKC oppure delle chinasi specifiche che vengono chiamate GRK (da G protein-coupled receptor kinase), fosforilano questi residui. La fosforilazione del recettore rappresenta uno dei meccanismi di spegnimento del segnale; c'è una sorta di feedback (negativo) per cui questi recettori attivano molte chinasi, però le chinasi attivate al tempo stesso generano alla fine un segnale inibitorio. Questi recettori rappresentano la più ampia gamma di recettori espressi in cellule di mammiferi; il sequenziamento del genoma umano ne ha messo in evidenza almeno un migliaio di cui la gran parte sono orfani, cioè non si sa cosa legano. Alcuni sono probabilmente geni duplicati che però non hanno neanche il ligando perché hanno alterazioni strutturali non funzionanti. (*diapositiva 3 lezione 10)* Per esempio vi è tutta una serie di neurotrasmettitori importantissimi come le catecolamine, o l'acetilcolina, che sono riconosciuti da questi recettori; inoltre essi riconoscono tutta una serie di ormoni peptidici che poi segnalano la produzione di ormoni da parte di organi endocrini; poi tutta una serie di molecole biologicamente attive, come eicosanoidi, cioè tutti i derivati dall'acido arachidonico, le prostaglandine, prostacicline, tromboxani, leucotrieni. Mediatori di diversa origine, come la trombina, tutta una serie di molecole come bradichinina, C3a e C5a, nucleotidi come l'ATP e infine quell'amplissima gamma di citochine che sono essenziali nel reclutamento leucocitario che sono le chemochine, quindi moltissime essenziali molecole che regolano la fisiologia del nostro organismo e la risposta a una serie di processi patologici, sono riconosciute da questa classe di recettori e quindi trasducono il segnale in modo abbastanza stereotipato.

Il meccanismo di funzionamento di questi recettori è sintetizzato in 3 componenti (*diapositiva 4 lezione 10)* :

1. <u>recettore</u> vero e proprio

2. sistema di trasduzione: questi recettori utilizzano queste <u>proteine G trimeriche</u>

3. <u>effettori</u>: sono enzimi o canali di membrana che sono bersaglio di queste proteine G trimeriche

Vengono chiamate proteine G trimeriche perché sono composte da una <u>subunità α</u> e una <u>subunità βγ</u> che in realtà sono associate in modo stabile; βγ si lega in condizione di riposo alla subunità α.

Vi sono diverse isoforme di subunità α, β e γ, quindi la combinazione può essere molto ampia. Questo sistema di trasduzione del segnale da parte delle proteine G trimeriche ha moltissime analogie con la trasduzione del segnale da parte delle small GTP-binding protein (le small GTP-binding protein sono state chiamate small perchè hanno un peso molecolare di circa 20-22 kDa, mentre la subunità α che è analoga alle small GTP-binding protein e che, come vedremo, può scambiare GDP con GTP ha un peso molecolare attorno ai 41-42 kDa, quindi circa il doppio – quindi queste sono le proteine leganti il GTP grandi in contrasto con quelle piccole). Il meccanismo di trasduzione del segnale è governato non da GEFs (come nel caso delle small GTP-binding protein, in cui GEFs favoriscono lo scambio GDP-GTP) ma in questo caso sono governate dall'interazione ligando-recettore; cioè quando un ligando appropriato si lega a uno dei recettori seven- transmembrane spanning si trasmette una modificazione conformazionale alla subunità α che libera il GDP e (per lo stesso motivo per cui avviene con le small GTP-binding protein) siccome in condizioni normali la concentrazione del GTP è circa 10 volte maggiore (*rispetto al GDP*) all'interno di una cellula, per default si lega alla subunità α il GTP. L'interazione α-GTP determina una dissociazione del trimero e da una parte si forma l'α-GTP e dall'altra l'eterodimero βγ; entrambi, sia la forma α legata al GTP che la forma βγ staccata dalla subunità α, hanno la capacità di interagire con una serie di effettori, quindi questo è il meccanismo di trasduzione del segnale.

Il meccanismo con cui questo segnale si spegne è ancora una volta analogo a quello delle small GTP-binding protein, nel senso che la subunità α ha un'attività GTPasica intrinseca, quindi idrolizza GTP a GDP e la riformazione del complesso α-GDP comporta la riassociazione con la subunità βγ e quindi lo spegnimento del segnale. Quindi anche questi segnali sono solitamente transienti, molto rapidi, perché c'è un meccanismo di controllo intrinseco della loro durata.

In analogia ancora una volta con le small GTP-binding protein, vi sono anche dei regolatori dell'attività GTPasica intrinseca della subunità α e questi regolatori, che vengono chiamati RGS – regulation of G protein signaling, possono aumentare l'attività

GTPasica intrinseca, quindi agiscono un po' come le GAPs; in realtà hanno anche un meccanismo aggiuntivo e in alcuni casi alcuni regolatori interferiscono con l'interazione tra l' α-GTP e uno specifico effettore.

Le diverse subunità α, che sono circa 15, sono state ormai da tempo classificate in 4 gruppi fondamentali in base alla specificità con cui queste diverse molecole trasducono il segnale (*diapositiva 5-6 lezione 10)*:

- αs

- αi / α0

- αq

- α12/13

I bersagli delle principali tra queste diverse subunità sono stati bene caratterizzati: nel caso dell'αs e dell'αi è l'enzima adenilato ciclasi che converte ATP in cAMP e che quindi attiva una serin-treonin chinasi che è la PKA (protein chinasi cAMP-dipendente). **αs** è chiamata così in quanto è stimolatoria, cioè stimola l'adenilato ciclasi, l'**αi** invece è inibitoria, quindi inibisce l'adenilato ciclasi.

Il secondo gruppo di α ben caratterizzate è rappresentano dalle così dette **αq** che hanno come bersaglio un altro enzima: le fosfolipasi C isoforma β. Queste sono delle fosfolipasi fosfoinositide-specifiche, cioè hanno come substrato, nell'ambito dei fosfolipidi della membrana, i fosfoinositidi (*diapositiva 9 lezione 10)*. Le fosfolipasi sono responsabili della liberazione di Ca^{2+} citoplasmatico e della formazione di diacilglicerolo.

Le **α12/13** sono peculiari nel senso che sono state definite come le subunità che collegano le Gα grandi e le G piccole. Le α12-13, nella forma legata al GTP, interagiscono con dei GEFs, che sono GEFs per una particolare famiglia di small GTPasi, che è la famiglia delle Rho. Quindi attivano delle small GTP-binding protein che poi possono attivare altre cose, come la rho-chinasi.

Anche se per molto tempo la subunità βγ emerse come una subunità a funzione strutturale, per far cioè funzionare la subunità α, in realtà anche la subunità βγ staccata da quella α-GTP è in grado di interagire con due enzimi:

1. fosfolipasi C nell'isoforma β

2. un'isoforma particolare di una classe di enzimi: le fosfatidil-inositolo 3 chinasi, molto importanti nella produzione di diversi tipi di segnale. Nelle cellule immuni questa attivazione ha un significato particolare.

L'attivazione della fosfolipasi C da parte della subunità βγ fosfoinositide-specifico spiegano da un certo punto di vista perché tutti gli agonisti, se studiati in vitro, che reagiscono con questi recettori accoppiati a queste proteine G trimeriche sono in grado di generare segnali Ca^{2+} e diacilglicerolo: al di là di quello che fa la subunità α-GTP, la dissociazione della subunità βγ è in grado, attivando questa classe di fosfolipasi, di generare segnali Ca^{2+} e diacilglicerolo proteina chinasi C dipendenti.

αs e αi sono in grado di attivare l'adenilato ciclasi per la formazione di cAMP e la protein chinasi A e α s si trova anche nel contesto di una trasduzione del segnale molto importante da parte delle catecolamine a livello del muscolo cardiaco; inoltre sono anche il bersaglio di tossine, *(diapositiva 8 lezione 10)*:

a) la tossina colerica ADP ribosila la subunità αs e l'attiva. Questa attivazione è dovuta al fatto che la tossina colerica ADP ribosila la subunità αs in un punto particolare della molecola che è quello che ha attività GTPasica e questa ADP ribosilazione impedisce l'attività GTPasica della subunità αs legata a GTP. Per default quindi la subunità α ADP ribosilata dalla tossina colerica rimane nella forma legata al GTP e continua ad attivare l'adenilato ciclasi e quindi la formazione del cAMP e quindi la attivazione di protein chinasi A. Questa sequenza di eventi, molto importanti nella patogenesi del colera e di altre malattie infettive del tratto enterico in cui l'attivazione prolungata della protein chinasi A attraverso la fosforilazione di quel dominio regolatore del CFTR apre i canali per il Cl, determina una massiva secrezione di Cl^- e secondariamente di Na^+ e acqua nel lume intestinale con la conseguenza di diarrea acquosa.

b) Alcune delle stesse cose succedono con un'altra tossina che è prodotta dalla Bordetella pertussis, che è un patogeno soprattutto delle vie aeree superiori. In questo caso la tossina, che è sempre una tossina ADP ribosilante, ADP ribosila la subunità αi; però questa ADP ribosilazione ha un'altra conseguenza rispetto a quella mediata dalla tossina colerica perchè avviene in un'altra regione della molecola. Sostanzialmente determina un'inattivazione della subunità αi, cioè impedisce la dissociazione dal GDP e il legame col GTP, quindi la conseguenza è un'inibizione dell' αi. L' αi normalmente inibisce l'adenilato ciclasi quindi l'inibizione di un'inibizione risulta in un potenziamento. Quindi, una delle conseguenze del trattamento della cellula con la tossina della pertosse, è un'attivazione dell'adenilato ciclasi con un aumento del cAMP. L'altra conseguenza ha a che fare col fatto che la subunità βγ, se noi congeliamo la subunità α nella forma legata al GDP, non si dissocia più dalla subunità α e quindi non può interagire con i suoi effettori. Infatti in moltissime cellule trattate con la tossina della pertosse si determina un'inibizione dei segnali dipendenti sia

dalla fosfolipasi C che da fosfatidil-inositolo 3 chinasi in quanto viene inibita la funzione della subunità βγ. Questo ha una certa importanza nel meccanismo di paralisi di reclutamento di cellule infiammatorie e immunitarie nel sito in cui si sviluppa il microrganismo responsabile della pertosse proprio perchè l'aumento del cAMP accoppiato al blocco dell'attivazione della fosfolipasi C β e quindi dei segnali Ca^{2+} impedisce il reclutamento di queste cellule nel sito di flogosi e quindi causa un overgrowth del batterio.

Il diacilglicerolo è un attivatore di una classe particolare di enzimi che sono le protein chinasi C, le quali hanno diversi substrati tra cui delle altre fosfolipasi come le fosfolipasi A2, le fosfolipasi D e a valle di queste fosfolipasi ci sono tutta una serie di derivati dell'acido arachidonico, quindi gli eicosanoidi oppure l'acido fosfatidico che è in grado di generare diversi segnali e di attivare diversi fenomeni di risposta cellulare.

Via di trasduzione del segnale mediata da fosfolipasi C fosfoinositide specifiche

(esistono infatti fosfolipasi C che hanno come substrato altri fosfolipidi della membrana come fosfatidilcolina, fosfatidilserina)

Queste fosfolipasi C hanno come substrato un fosfolipide, il fosfatidil-inositolo 4-5 bifosfato o **PIP2**. *(diapositiva 10 lezione 10)*

Le fosfolipasi C idrolizzano il fosfolipide liberando una molecola idrosolubile nel citosol, costituita da uno zucchero, cioè l'inositolo, fosforilato in 3 posizioni (1, 4 e 5): questo è l'inositolo 1,4,5-trifosfato o **IP3**. Dopo questa reazione enzimatica ancorato alla membrana rimane il diacilglicerolo **DAG**, cioè una molecola di glicerolo in cui sono rimaste attaccate due molecole idrofobiche, cioè i due acidi grassi; il terzo atomo di carbonio del diacilglicerolo ha un gruppo idrossilico che rimane l'unico gruppo polare. Ciò permette questa molecola di sprofondarsi nel microambiente idrofobico del doppio strato della membrana avendo questo gruppo idrossilico libero nella faccia interna della membrana stessa. Per precisione le fosfolipasi C fosfoinositide specifiche, cioè in grado di mediare queste reazioni, sono classificabili in almeno 4 gruppi:

1. fosolipasi C che vengono chiamate fosfolipasi Cγ, che sono tra gli enzimi che si legano ai recettori tirosin chinasici, cioè ai recettori per i fattori di crescita; quindi sono quel particolare gruppo di fosfolipasi C che vengono attivate da segnali di fosforilazione in tirosina. (le ritroveremo proprio perchè ci sono altri eventi di fosforilazione in tirosina che attivano fosfolipasi Cγ che possono mediare segnali Ca, diacilglicerolo dipendenti). Queste fosfolipasi C hanno di particolare dei domini SH2 che consentono loro di interagire con fosfotirosine; inoltre possono essere fosforilati in tirosina e la fosforilazione in tirosina da parte delle tirosin chinasi a cui si legano è un evento attivante.

2. gruppo delle isoforme β, che sono quelle classicamente attivate o dalla Gαq o dalla subunità βγ di tutte le proteine G trimeriche

3. gruppo di fosfolipasi Cd attivate da Ca^{2+}, quindi c'è un loop di calcium-induced calcium signaling perchè il Ca^{2+}, che come vedremo è liberato da IP3, può attivare altre fosfolipasi C aumentando la formazione di se stesso

4. gruppo di fosfolipasi Ce che è attivato da Ras, quindi esiste una comunicazione a doppia via tra tutti i segnali dipendenti dalle big e small GTP binding protein. Ras può attivare queste fosfolipasi C che hanno lo stesso effetto. C'è una grossa ridondanza nella generazione di questi segnali.

(diapositiva 11 e 12 lezione 10)

Il fosfolipide può essere metabolizzato da diversi enzimi che portano alla formazione di diversi prodotti. Queste fosfolipasi A2 sono anche a valle della via di formazione di diacilglicerolo e possono essere attivate attraverso varie strade.

I prodotti della digestione del PIP2- fosfatidil-inositolo 4,5 bifosfato sono diacilgligerolo e PIP3.

Il **diacilglicerolo** è un fosfolipide che rimane ancorato alla faccia interna della membrana plasmatica ed è emerso come un regolatore di un'importante classe di protein chinasi, che sono serin-treonin chinasi, e che sono state chiamate protein chinasi C perchè la loro prima proprietà caaratterizzata fu quella di essere Ca^{2+} dipendenti. Queste protein chinasi C sono suddivise oggi perlomeno in 3 sottogruppi*:*

1. cPKC – classiche *(diapositiva 13 lezione 10)* perchè sono le prime ad essere state caratterizzate come molecole che erano in grado di legare Ca^{2+} e altri lipidi, come per esempio fosfatidilserina, e legare anche il diacilglicerolo. Quindi il diacilglicerolo che si forma una volta idrolizzato il PIP2 è in grado di legare queste protein chinasi e assieme all'aumento di Ca^{2+} che avviene attraverso un'altra via, cioè quella del PIP3, vengono attivate queste protein chinasi. Queste protein chinasi sono state

caratterizzate, e studiate moltissimo, a partire dagli anni '80 quando si apprezzò che erano in grado di regolare diverse risposte cellulari, comprese la crescita cellulare, e quindi vennero inizialmente caratterizzati come enzimi potenzialmente in grado di indurre la trasformazione neoplastica, anche perchè emersero come responsabili di quel fenomeno chiamato “tumor promotion”, cioè promozione del tumore. Queste protein chinasi C classiche sono quelle che vengono legate e attivate dagli esteri del forbolo. L’acronimo noto è PMA, forbolo-miristato-acetato, che è il principio attivo dell'olio di croton, quell'irritante usato nei modelli di cancerogenesi che consentirono di stabilire come la storia naturale del tumore avviene in più tappe (cioè innanzitutto una tappa di iniziazione e poi di promozione e alla fine di progressione). La tappa di promozione che faceva, stimolando la proliferazione cellulare, emergere cloni che avevano dei geni mutati che gli davano un vantaggio selettivo nella crescita rispetto alle cellule del tessuto, era dovuta sostanzialmente all'attivazione di questa classe di protein chinasi C. Questo è dovuto al fatto che il principio attivo dell'olio di croton, che veniva usato come irritante sulla cute dei ratti in questi esperimenti, cioè questo PMA, questi esteri del forbolo sono degli analoghi del diacilglicerolo e si legano e attivano queste isoforme classiche di protein chinasi C. Quindi le classiche sono 1) diacilglicerolo (o esteri del forbolo) 2) fosfatidil-serina e 3) Ca^{2+} – dipendenti .

2. Successivamente, col progredire delle tecniche di biologia molecolare e quindi con lo screening con probe rappresentativi soprattutto del dominio chinasico delle isoforme classiche, emersero delle proteine chinasi C che vengono definite nuove PKC, **nPKC,** che hanno una struttura diversa e in particolare hanno perso il dominio che conferisce la Ca^{2+}-dipendenza *(diapositiva 14 lezione 10)*. Queste proteine chinasi C vengono attivate direttamente dal diacilglicerolo e fosfatidilserina ma non richiedono l'azione del Ca^{2+}.

3. vi sono addirittura isoforme cosiddette atipiche, **aPKC**, *(diapositiva 15 lezione 10)* che non sono né Ca^{2+} né diacilglicerolo dipendenti ma che vengono attivate per esempio da fosfatidilserina, da residui di acidi grassi liberati per esempio da fosfolipasi A2.

Il secondo grosso sistema di trasduzione conseguenza dell'idrolisi del PIP2 è la liberazione di Ca^{2+} dagli store intracellulari o attraverso la membrana plasmatica. Omeostasi del Ca^{2+} *(diapositiva 16 lezione 10)*: la quantità di Ca^{2+} libero nel citosol all'interno delle cellule è bassissima, circa 100 nM (0,1 μM) e questo lo rende un segnale, un secondo messaggero molto utile, nel senso che un aumento di questa concentrazione è facilmente raggiungibile soprattutto attraversano una serie di ON mechanisms. Questi sono meccanismi on che possono portare il Ca^{2+} libero nel citosol attorno alle 500 nM - 1 μM (in realtà vedremo che questa concentrazione può essere ben più elevata di così) e successivamente però questa concentrazione, che attiva tutta una serie di processi Ca^{2+} sensibili, viene riportata alle condizioni di riposo attraverso una serie di OFF mechanisms. La concentrazione extracellulare di Ca^{2+}, Ca^{2+} libero, è tra 1-2 mM e quindi il gradiente di Ca^{2+} tra l'esterno e l'interno della cellula è tra 10000 volte; quindi qualsiasi apertura, per esempio i canali Ca^{2+} della membrana plasmatica, fa entrare massivamente una quantità di Ca^{2+} enorme proprio perché c'è un gradiente estremamente favorevole sia chimico (cioè questa differenza enorme tra esterno ed interno) sia elettrico (perché la negatività della faccia interna della membrana favorisce l'ingresso di Ca^{2+} all'interno della cellula). Mantenere le concentrazioni di Ca^{2+} così basse dentro la cellula richiede molto lavoro, cioè tutta una serie di reazione ATP-dipendenti, proprio per mantenere la concentrazione di Ca^{2+} in questi range fisiologici; infatti qualsiasi danno cellulare che comporti una diminuzione della sintesi di ATP ha come una delle prime conseguenze un enorme aumento dei livelli di Ca^{2+} libero citosolico e l'attivazione di tutta una serie di processi Ca^{2+}-dipendenti tra cui processi dannosi come l'attivazione di proteasi.

Liberazione di calcio da store intracellulari

Nelle cellule muscolari il meccanismo principale di aumento del Ca^{2+} libero citosolico è la liberazione dagli store intracellulari.

Anche in questo caso ci sono diverse classi di recettori, non solo 7-transmembrane ma anche altri, che causano l’idrolisi di PIP2, formano il IP3 *(diapositiva 17 lezione 10)*. IP3 è un ligando per un recettore per il IP3, che è anche un canale per il Ca^{2+}, quindi il legame dell'IP3 al canale lo apre e determina l'uscita di Ca^{2+} da delle vescicole che sono sostanzialmente rappresentate da cisterne del reticolo endoplasmatico liscio. Il reticolo endoplasmatico liscio è lo store intracellulare di Ca^{2+} e l'IP3 legandosi a questi canali per il Ca^{2+} presenti nel reticolo li apre e fa uscire Ca^{2+}. *(Qui parla di cellule non muscolari?)*

Questa situazione è analoga, anche se leggermente diversa, nelle cellule muscolari cardiache o del muscolo striato scheletrico in cui gli store intracellulari sono rappresentati da queste cisterne ben strutturate del reticolo sarcoplasmico e hanno questi recettori per la rianodina (che non è una molecola fisiologica ma semplicemente un alcaloide che si usa per aprire questi canali sperimentalmente). Questi recettori vengono chiamati RYR1 nel muscolo scheletrico, RYR2 in quello cardiaco. Il meccanismo di funzionamento e di regolazione di questi canali/recettori per la rianodina è diverso nel senso che nel muscolo scheletrico questi sono associati a un sensore di voltaggio, per cui la depolarizzazione del muscolo scheletrico comporta una modificazione conformazionale di RYR1 e l'uscita di Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmico; nelle cellule muscolari cardiache invece questo meccanismo è più complicato in quanto esiste un vero e proprio canale per il Ca^{2+} che è un VOC (un voltage-operated-channel), cioè è un canale aperto dalle modificazioni di voltaggio, dalla depolarizzazione della membrana del muscolo cardiaco. Questo

canale fa entrare Ca^{2+} e questo ingresso di Ca^{2+} in qualche modo sensibilizza RYR2 determinandone l'apertura e una massiva uscita di Ca^{2+}. Questo fenomeno un po' complesso è stato chiamato calcium-induced calcium release, cioè rilascio di Ca^{2+} indotto dal Ca^{2+}. Studiando la contrazione del muscolo scheletrico e del muscolo cardiaco isolati si vede chiaramente che la contrazione nel muscolo scheletrico non richiede Ca^{2+} esterno perché basta indurre una depolarizzazione per avere un rilascio dagli store, mentre la contrazione del muscolo cardiaco è strettamente dipendente dal Ca^{2+} extracellulare (che è responsabile del calcium-induced calcium release).

Ingresso di calcio dall'esterno all'interno della cellula

Il Ca^{2+} può entrare anche dall'esterno all'interno della cellula con diversi meccanismi *(diapositiva 18 lezione 10)* :

- grazie alla presenza di **VOC,** che sono presenti in cellule nervose, sono chiamati voltage-operated-channel e sono aperti da eventi di depolarizzazione;

- mediante una serie di **ROC** (receptor-operated channel), tra cui il recettore per l'IP3 (il canale per il Ca^{2+} aperto dall'IP3); vi sono recettori canale che riconoscono l'acetilcolina oppure il glutammato nel sistema nervoso centrale

- mediante canali **SOC** (store-operated-channel), che sono dei canali molto particolari, sensibili alla quantità di Ca^{2+} libero accumulato negli store intracellulari (nel reticolo sarcoplasmico delle cellule muscolari o nel reticolo endoplasmatico delle cellule non muscolari). Per l'asimmetria della concentrazione di $Ca^{2+,}$ qualsiasi apertura dei canali per il Ca^{2+} determina ingresso di Ca^{2+} dall'esterno verso l'interno o, nel caso particolare dei canali che sono localizzati sugli store (reticolo endoplesmico o sarcoplasmico), la loro apertura determina uscita di Ca^{2+} dallo store stesso (in la cui concentrazione di Ca^{2+} libero è simile a quella dell'ambiente extracellulare cioè attorno a 1-2 mM). Quindi se il canale si apre, essendo nel citosol la concentrazione di Ca^{2+} 100 nM, cioè 10000 volte di meno, il Ca^{2+} esce. Questi SOCs sono stati caratterizzati dal punto di vista fisiologico e molecolare e sono degli strani sistemi che funzionano sostanzialmente in questo modo: vi sono delle molecole chiamate Stim che sono dissociate se il Ca^{2+} è presente in elevate concentrazioni negli store e invece in seguito a deplezione di Ca^{2+} dagli store si aggregano sulla superficie del reticolo endoplasmatico; in seguito a questa aggregazione sono in grado di interagire con dei canali presenti sulla membrana plasmatica. Questa interazione tra gli Stim e questi canali per il Ca^{2+} determina un'apertura di questi ultimi, quindi il Ca^{2+} entra e poi viene in qualche modo pompato nello store intracellulare. *(diapositiva 19 lezione 10)*

Vi sono tutta una serie di <u>meccanismi off</u> che regolano la concentrazione di Ca^{2+} libero nel citosol. Questi comprendono

1. delle Ca^{2+}-ATPasi, quindi degli enzimi che richiedono consumo di energia per la necessità di pompare Ca^{2+} contro gradiente. Questo pompaggio contro gradiente significa pompaggio del Ca^{2+} da interno verso l'esterno, oppure pompaggio del Ca^{2+} nel reticolo endoplesmico o sarcoplasmico che comunque ha una concentrazione di Ca^{2+} che è superiore a quella del citosol anche dopo stimolazione.

2. Esistono questi SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase) che in qualche modo riempiono nuovamente i depositi di Ca^{2+} (con quel meccanismo di salvaguardia dello store operateded calcium channel); riempiono nuovamente i depositi di Ca^{2+} una volta che c'è stata un'uscita di Ca^{2+} dal deposito stesso *(diapositiva 20 lezione 10).*

Vi sono poi 2 meccanismi aggiuntivi interessanti:

3. è rappresentato da degli <u>antiporti</u> che sono localizzati sulla membrana di tutte le cellule, soprattutto di quelle muscolari, in cui l'uscita di Ca^{2+} è accoppiata a un ingresso di $Na^{+.}$ L'ingresso di Na^{+} nella cellula è ovviamente facilitato in quanto il Na^{+} è molto più concentrato fuori che dentro alla cellula e in più la membrana è negativa. Quindi l'energia generata da questo ingresso di Na^{+} può essere accoppiata a un'uscita di Ca^{2+}. Questo cotrasportatore Na^{+}/Ca^{2+} è importante nei contesti in cui abbiamo procedure farmacologiche (o dipendenti da altri fenomeni) che determinano un aumento del Na^{+} intracellulare, in particolare tutte le procedure farmacologiche classiche che portano all'inibizione della Na^{+}/K^{+} ATPasi. La digitale è una dei primi importanti farmaci usati in cardiologia, e inibisce la Na^{+}/K^{+} ATPasi. Inibendo la Na^{+}/K^{+} ATPasi c'è un riequilibrio del Na^{+} e del K^{+} per cui si ha un'aumentata concentrazione di Na^{+} dentro le cellule muscolari cardiache. L'aumentata concentrazione di Na^{+} in qualche modo riduce la funzione di questo *(Na^{+}/Ca^{2+})* antiporto, perché il gradiente per il Na^{+} diventa meno alto: si ha una riduzione marcata dell'ingresso di Na^{+} e quindi una ridotta uscita di Ca^{2+}. Questo determina per un periodo, che non è infinito, un aumento del Ca^{2+} citosolico e quindi un'aumentata forza di contrazione muscolare che spiega l'effetto dei farmaci che inibiscono la Na^{+}/K^{+} ATPasi sulla contrazione cardiaca.

4. l'altro meccanismo di riduzione del Ca^{2+} citosolico è un meccanismo che è stato sottoposto a sopra e sottovalutazioni in alternanza per diverso tempo. Si tratta di un <u>uptake di Ca^{2+} da parte dei mitocondri</u>. L'uptake di Ca^{2+} da parte dei mitocondri fu un'osservazione classica a partire dagli anni '60; i mitocondri isolati si dimostrarono essere in grado di assorbire Ca^{2+} dall'ambiente e questo Ca^{2+} venne implicato inizialmente anche in fenomeni di modulazione positiva dell'efficacia della sintesi di ATP (quindi

sembrava anche essere importante per la funzione di questi organelli). Successivamente però questo uptake di Ca^{2+} da parte dei mitocondri venne negato e ritenuto un artifizio di laboratorio (c'è un'importante teoria nella filosofia della scienza che è quello che distingue la scienza dalle altre discipline non scientifiche: i processi di falsificazione. La scienza nel momento in cui che mette a punto delle tecnologie, delle metodologie più raffinate può falsificare una teoria precedente). Questa falsificazione della capacità dei mitocondri di assumere Ca^{2+} derivò dalla messa a punto da parte di un ricercatore cinese assieme ad un importante ricercatore dell'Università di Padova, il professor Pozzan, di una serie di probe che erano per la prima volta in grado di misurare la concentrazione di Ca^{2+} intracellulare. Queste molecole sono delle molecole che possono entrare attraverso la membrana plasmatica ma che successivamente vengono modificate nel citosol e non escono più. Legano il Ca^{2+} e legando Ca^{2+} modificano la loro fluorescenza: sono quindi dei probe eccezionali per misurare le variazioni di Ca^{2+} libero all'interno della cellula. Roger Tsien che per primo provò a mettere a punto queste molecole ha poi preso il premio Nobel per la chimica alcuni anni fa. In una prima istanza queste molecole dissero che in realtà la concentrazione di Ca^{2+} libero nel citosol in una cellula stimolata anche in modo massimale difficilmente supera una concentrazione di 1μM, cioè da 0,1μM ovvero 100nM della concentrazione basale si arriva ad un aumento di almeno 10 volte, ma non di più. Se si studia l'uptake di Ca^{2+} da parte dei mitocondri isolati a concentrazione di 1μM di Ca^{2+} esterno, cioè quella che è presumibilmente la concentrazione massimale in cellule stimolate di Ca^{2+} libero nel citosol, non c'è nessun uptake di Ca^{2+}. Devono esserci concentrazioni superiori a 2-2,5 fino a 3mM per riuscire a fare aumentare l'uptake di Ca^{2+} da parte dei mitocondri. Quindi la prima falsificazione: dimentichiamo tutti i valori fatti nei mitocondri in vitro: il mitocondrio non determina uptake di Ca^{2+}.

La scienza procede per falsificazioni, questa conclusione fu poi ulteriormente falsificata: i primi studi con questi probe per misurare la concentrazione di Ca^{2+} libero citosolico furono studi fatti su popolazioni di cellule; se si studiano in una provetta milioni di cellule che vengono stimolate, il segnale che si vede è la somma dei segnali che derivano dalle varie cellule (quindi una cellula può essere stimolata al massimo quando un'altra è in condizioni di riposo oppure non è responsiva per altri motivi). La grossa seconda parte importante fu rappresentata da una serie di metodologie microscopiche, in particolare la microscopia confocale, che consentì di misurare le variazioni di Ca^{2+} a livello di singola cellula. Andando a studiare sempre con questi probe la concentrazione di Ca^{2+} a livello della singola cellula si osservò una cosa non attesa: c'erano dei microambienti nelle cellule in cui la concentrazione di Ca^{2+} poteva arrivare anche a concentrazioni di 5 μM; non solo, le tecniche microscopiche permisero anche di osservare che queste regioni in cui c'era un'elevata concentrazione di Ca^{2+} erano localizzate vicino a cisterne del reticolo endoplasmico; in queste zone del reticolo endoplasmico si osservava spesso la presenza di una serie di mitocondri vicini. Quindi questo fece pensare chiaramente che nel punto in cui il Ca^{2+} diffonde, cioè in cui esce dal reticolo endoplasmico, la concentrazione in quel microambiente è molto elevata. Il Ca^{2+} diffonde e non solo: in quel microambiente ci sono anche dei mitocondri che possono sentire queste concentrazioni di Ca^{2+} estremamente elevate. Quindi si ritornò agli anni '60 con la conclusione che i mitocondri potevano assumere Ca^{2+}; questa osservazione venne poi definitivamente dimostrata da Pozzan a Padova usando dei probe che andavano a finire selettivamente nei mitocondri. Quindi i mitocondri sono una sorta di sensori del Ca^{2+} nei microambienti della cellula. In particolare emerse appunto che il mitocondrio può essere un organello che, tra le sue varie funzioni, è anche in grado di comunicare col reticolo endoplasmatico e soprattutto con un reticolo endoplasmatico che per esempio, sottoposto a una serie di stress o di danni, possa rilasciare elevatissime quantità di Ca^{2+}. Queste vanno in qualche modo tamponate e quindi il mitocondrio può fare questo buffering (tamponamento) del Ca^{2+}, che in parte usa per la sintesi di ATP (ovvero un'appropriata concentrazione di Ca^{2+} favorisce la sintesi di ATP) come eventuale contrapposizione a danni che si possono essere sviluppati nella cellula nel reticolo endoplasmatico. Come tutti questi sistemi, la cosa importante che è emersa è che quando questo sistema di uptake di Ca^{2+} da parte del mitocondrio è saturato, nel senso che il danno al reticolo endoplasmico fa un *(incomprensibile)* di Ca^{2+} molto elevato oltre al Ca^{2+} che viene dalla membrana plasmatica, ad un certo punto la cellula può decidere di andare incontro a un fenomeno apoptotico, cioè si protegge da una lisi con l'induzione di apoptosi. Con elevate concentrazioni di Ca^{2+} si ha un innesco del processo apoptotico cioè dell'apertura di quei canali sulla membrana mitocondriale esterna che sono in grado di favorire l'apoptosi.

I fenomeni Ca^{2+} dipendenti sono moltissimi (*diapositiva 21 lezione 10)*, quindi questo tipo di segnale è molto importante. Il meccanismo con cui il Ca^{2+} regola alcuni di questi processi è noto:

- può legarsi direttamente a una serie di proteine regolatrici come la troponina C che è implicata nella contrazione muscolare;

- si lega ad una specie di sensore del Ca^{2+} citosolico, la proteina calmodulina che nella forma legata al Ca^{2+} può legarsi a tutta una serie di enzimi favorendone l'azione;

- il Ca^{2+}, indipendentemente dalla calmodulina, regola l'attivazione di una serie di enzimi. - Inoltre si lega a una serie di proteine calcium-binding e fosfolipidi che sono importanti nella fusione della membrana: il Ca^{2+} è un segnale essenziale per la degranulazione cioè per l'interazione tra vescicole intracellulari e la membrana plasmatica. *(diapositiva 22 lezione 10)*

Molto importante è il fatto che questi segnali Ca^{2+}, nella cellula muscolare cardiaca in particolare, possono essere regolati da segnali β-adrenergici, cioè da recettori accoppiati a proteine G trimeriche *(diapositiva 24 lezione 10)*. In tutte le cellule, ma in particolare nella cellula muscolare cardiaca, il Ca^{2+} liberato viene riassunto da SERCA e l'attività del SERCA è regolata dalla molecola di fosfolambano che a sua volta viene inibito da eventi di fosforilazione. I recettori β-adrenergici (che riconoscono in

particolare adrenalina a livello del muscolo cardiaco con maggiore affinità della noradrenalina) sono recettori accoppiati a G αs che trasducono il segnale attraverso l'adenilato ciclasi; l'adenilato ciclasi determina la formazione dell'cAMP e l'attivazione della protein chinasi A. La protein chinasi A attivata da questi segnali β-adrenergici a livello del muscolo cardiaco determina quattro importanti eventi che determinano aumento della forza di contrazione cardiaca e della velocità di contrazione, agendo sostanzialmente a questi quattro livelli *(diapositive 25, 26, 27 lezione 10)*:

1. la fosforilazione della troponina C favorisce la dissociazione del Ca^{2+} dai miofilamenti, quindi accelera il processo di accoppiamento rilasciamento-contrazione;

2. la fosforilazione del fosfolambano da parte della protein chinasi A; inibendo il fosfolambano aumenta l'attività del SERCA, quindi rende molto più efficiente l'uptake di Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmico e la disponibilità di Ca^{2+} per una successiva fase di contrazione cardiaca;

3. la PKA fosforila il recettore per la rianodina RYR2, quindi questo sposta l'equilibrio verso una più efficace apertura del canale con un aumentato rilascio di Ca^{2+} dagli store in cui il Ca^{2+} era stato con molta efficienza riaccumulato;

4. agisce sui canali VOC per il Ca^{2+} sulla membrana plasmatica favorendo la loro apertura e il rilascio di Ca^{2+} nel citosol e quindi Calcium induced calcium release.

Tutti questi sono segnali molto efficaci in termini acuti nella relazione che c'è tra efficacia della contrazione muscolare cardiaca e il rilascio di catecolamine. Infatti questo succede anche in condizioni patologiche: qualsiasi danno al miocardio (miocardio sclerosi, insufficienza cardiaca…) determina una riduzione della gittata cardiaca che comporta una ridotta perfusione delle arteriole di resistenza. Quindi c'è una stimolazione dei barocettori per la ridotta gittata e portata cardiaca, con un aumento del tono simpatico che stabilisce un compenso acuto, una stimolazione β-adrenergica dei miocardiociti con un aumento della frequenza e della forza di contrazione. Questa sequenza di eventi, ovvero questo compenso acuto, avviene anche in situazioni fisiologiche di risposta ad una serie di stimoli (stress, esercizio muscolare...) *(diapositiva 28 lezione 10)* Questo compenso acuto ha però una durata limitata per una serie di motivi, il cui concetto centrale è che questa prolungata stimolazione β-adrenergica innesca un circolo vizioso di amplificazione del danno miocardico che è sostanzialmente determinato dal fatto che la stimolazione β-adrenergica prolungata determina

- un aumentato consumo di ATP a livello della cellula muscolare,

- l'induzione di fenomeni di apoptosi per questi prolungati livelli di Ca^{2+} citosolico,

- favorisce la comparsa di aritmie

- è responsabile del fenomeno dell'ipertrofia del cuore. In questo caso è una forma di ipertrofia molto particolare che non è efficiente dal punto di vista della funzione cardiaca.

Questo circolo vizioso di amplificazione del danno che si manifesta nella prolungata stimolazione β-adrenergica viene limitato da 2 meccanismi, uno endogeno e l'altro esogeno:

1. un meccanismo **endogeno** di protezione è rappresentato dal fatto che la prolungata stimolazione β-adrenergica e l'attivazione della protein chinasi A hanno come conseguenza la fosforilazione della coda citoplasmatica dei recettori β-adrenergici (questa classe di recettori ha residui di serina e treonina che possono essere fosforilati da diverse chinasi, tra cui la protein chinasi A). La fosforilazione del recettore è implicata in segnali di spegnimento, cioè la downregulation dell'espressione dei recettori β-adrenergici (quella che in fisiopatologia viene anche chiamata resetting dei recettori) per cui progressivamente la cellula muscolare cardiaca riduce l'espressione del recettore e quindi la capacità di sentire il segnale β-adrenergico

2. un meccanismo **esogeno** di protezione è un paradosso farmacologico, che venne inizialmente visto come una sorta di eresia, ed è rappresentato dal fatto che farmaci β-bloccanti sono la classe di farmaci più usata nel trattamento dello scompenso cardiaco proprio perchè bloccando questa prolungata stimolazione β-adrenergica proteggono il cuore e la cellula muscolare da fenomeni di danno e di apoptosi che sono irreversibili e che comportano il progressivo aumento dei processi aterosclerotici. Quindi uno stimolante delle funzioni cardiache come normalmente è la stimolazione β-adrenergica, che evidentemente si è evoluta nel contesto di una rapida reazione fuga o aggressione e che è accoppiata al rilascio di catecolamine è in realtà bersaglio di questi farmaci che cercano di bloccare questo fenomeno

3. un altro meccanismo **endogeno** di protezione dalla stimolazione β-adrenergica prolungata ci riporta alla filosofia cinese delle due grandi forze che regolano l'universo cioè Ying e Yang: mentre l'cAMP è in grado di stimolare i segnali Ca^{2+} dipendenti, c'è un altro nucleotide ciclico che è il cGMP che invece è in grado di inibire in parte questa iperstimolazione e l'aumento abnorme del Ca^{2+} citosolico *(diapositiva 29 lezione 10)*. cGMP può essere aumentato in 2 modi:

- da recettori che hanno un dominio guanilato-ciclasico,

- da guanilato ciclasi solubili che sono attivate dall'ossido di azoto.

(diapositiva 30 lezione 10)

Tra i recettori che hanno un dominio guanilato-ciclasico vi è un recettore per un ormone che è il recettore per il fattore natriuretico atriale (natriuretic peptide hormone); è un recettore che stimola una serie di eventi. Questo ormone enfatizza la natriuresi cioè l'eliminazione di Na^+ e acqua a livello renale e quindi una diminuzione dell'abnorme accumulo di liquidi che viene innescato per esempio dall'insufficienza del cuore sinistro e che aggrava le funzioni del cuore destro in quanto questi liquidi vanno a finire nel distretto venoso e quindi nel cuore destro.

cGMP attiva delle serin treonin chinasi che sono le protein chinasi G cGMP-dipendenti che generano segnali che inibiscono i fenomeni ipertrofici. Tutto ciò passa attraverso l'attivazione di protein chinasi G e questa attivazione riduce con diversi meccanismi i livelli di Ca^{2+} citosolico, favorendo l'estrusione di Ca^{2+} dalla membrana e riducendo il rilascio da store intracellulari (in questo caso importante è quello nel reticolo)

In questo contesto c'è anche un'azione della protein chinasi G sulla via della Rho e della Rho-chinasi. Questa via porta alla fosforilazione della catena leggera della miosina che favorisce l'accoppiamento acto-miosinico e quindi la contrazione cardiaca. La protein chinasi G inibisce questa via, favorendo l'equilibrio verso la forma defosforilata della catena leggera della miosina e quindi un'inibizione della contrazione muscolare e quindi del consumo di ATP che è uno dei fattori che può indurre processi di tipo apoptotico nella cellula muscolare cardiaca.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 26/11/2012

26/11/2012

Professore: Berton

Sbobinatore: Alessia Pretto

Revisore: Geoffrey Carli

Patologia generale e fisiopatologia clinica

LEZIONE 10

Recettori accoppiati a proteine G trimeriche (continuazione)

(Diapositiva 34, Lez 10)

Ci sono diversi siti importanti per la stimolazione β-adrenergica delle sinapsi, attraverso l'aumento prolungato dei livelli di calcio citosolico che portano allo sviluppo di alterazioni della muscolatura cardiaca sottoforma di ipertrofia.

La diapositiva riassume le tre principali modificazioni a carico del cuore, che comprendono la gran parte delle patologie cardiache:

1. La **dilatazione cardiaca** che comporta una lunghezza dei miociti molto maggiore rispetto allo spessore; quindi le cellule muscolari si allungano, perdono progressivamente efficacia nel corso della contrazione e soprattutto sono presenti fenomeni di fibrosi, morte cellulare e apoptosi.

(Tabella diapositiva 40, Lez 10) sono riportate le alterazioni di geni che codificano per proteine strutturali della parete cardiaca, che sono responsabili di questo fenomeno.

1. Il secondo caso riguarda l'ipertrofia che da un certo punto di vista viene divisa, anche se la conseguenza di un aumentato volume delle cellule muscolari soprattutto della parete cardiaca nel senso che non c'è soltanto un aumento delle dimensioni delle cellule ma ci possono anche essere fenomeni che riguardano l'interstizio, in particolare nella patologia cosiddetta ipertrofica in cui si ha un aumento della lunghezza inferiore allo spessore della fibra muscolare. Questo fenomeno che sarà trattato nel dettaglio dal prof. Minuz, è detto **ipertrofia concentrica** che ancora una volta si accompagna a fenomeni di fibrosi e di progressiva alterazione della funzione del cuore.
2. L'**ipertrofia fisiologica** è tipica dell'esercizio prolungato e intenso, in cui c'è questo fenomeno ipertrofico che innanzitutto non compromette le dimensioni del ventricolo sinistro (nell'ipertrofia concentrica si ha invece una progressiva restrizione della camera ventricolare) e soprattutto non si accompagna a fenomeni di fibrosi.

In questo caso abbiamo un aumento dello spessore delle fibre e la lunghezza delle fibre è superiore all'aumento di spessore.

(Diapositiva 35, Lez 10)

Sono illustrati i segnali che possono portare a queste modificazioni cardiache, le quali sono sostanzialmente dovute ad aumentata trascrizione dei geni che codificano per proteine strutturali della cellula muscolare cardiaca. Ve ne sono diversi e uno degli interessi, che però non è stato ancora chiarito nella sua sostanza, è comprendere quali sono i segnali che regolano il tipo di ipertrofia, cioè quella patologica rispetto a quelli che regolano quella fisiologica.

In realtà molti di questi segnali utilizzano vie che abbiamo già visto, canoniche. Per esempio ci sono tutta una serie di fattori di crescita, in particolare IGF(Insulin-Like Growth Factor) che segnala per l'attivazione di fosfatidilinositolo-3-chinasi della classe 1A e quella è appunto attivata dal segnale di fosforilazione della tirosina e tutto va attraverso l'attivazione di Ras alla cascata di MAP chinasi.

Un secondo importante aspetto di stimolazione riguarda tutta una serie di ligandi per recettori accoppiati a proteine G trimeriche.

Vi sono diverse molecole importanti nel regolare sia il tono vascolare che la funzione cardiaca e sono: l'endotelina, l'angiotensina II e le catecolamine.La ricezione di questi segnali da parte di questa classe di recettori porta a quello che sostanzialmente abbiamo visto. Inizialmente si era enfatizzato l'importante funzione dell'attivazione della fosfolipasi C (PLC) fosfoinositide-specifico; dall'altra parte della Gαq che era accoppiata ai recettori per queste molecole e quindi la generazione dei segnali di calcio PKC-dipendenti, però più recentemente è stato apprezzato anche il ruolo della fosfatidilinositolo-3-chinasi isoforma 1B cioè quella attivata dalla subunità βγ del recettore.

Infine c'è una serie di importanti segnali che derivano da una sorta di stress biomeccanico, nel senso che dipendono da una serie di integrine espresse dalle cellule muscolari cardiache, che reagiscono con proteine della matrice extracellulare ma ne riparleremo nel contesto della capacità di queste molecole di generare segnali attraveso tirosin chinasi di tipo citoplasmatico. Questa via porta ancora una volta all'attivazione di alcune di queste molecole, in particolare fosfatidilinositolo-3-chinasi e MAP chinasi. Tutte queste vie poi convergono nell'ipertrofia, quindi c'è un bilancio complesso tra diversi tipi di stimoli e stanno emergendo anche dei famaci che possono bloccare alcune vie di trasduzione importanti per questo processo *(l'ipertrofia, ndr).*

La via relativa dipendente dal calcio è stata particolarmente enfatizzata nel senso che il calcio regola la trascrizione di geni e quindi questo pathway che porta alla ipertrofia nelle cellule muscolari in diversi modi.

(Diapositiva 36, Lez 10)

Uno è rappresentato dall'attivazione di una serintreonin chinasi calcio-dipendente *(CaMK, ndr),* la quale regola lo stato di fosforilazione di alcuni regolatori della trascrizione genica e quindi favorisce il processo ipertrofico.

Lo schema della diapositiva è tratto da un lavoro in cui in un topo è stato espresso un transgene per questa chinasi calcio-dipendente *(CaMK, ndr).* Questo transgene viene iperespresso, ovviamente se messo sotto promotori tessuto-specifici. In questo caso è stato usato un promotore che va bene per il muscolo cardiaco.

Un'altra via con cui il calcio regola la trascrizione genica che deriva da una serie di studi fatti sui linfociti, consiste nel regolare una fosfatasi detta Calcineurina.

La Calcineurina defosforila il fattore di trascrizione NFAT, il quale solo nella forma defosforilata può migrare nel nucleo e legarsi ad una serie di sequenze promotrici per la trascrizione di questi geni.

(Diapositiva 37, Lez 10)

Qui è mostrata in dettaglio la struttura della calcineurina, la quale può essere regolata in diversi modi per esempio da alcuni farmaci che sono usati nel rigetto dei trapianti in quanto inibiscono un pathway di espansione di cloni linfocitari in grado di rigettare il trapianto.

L'NFAT defosforilato migra appunto nel nucleo e regola la trascrizione di una serie di geni.

(Diapositiva 38, Lez 10)

Qui ci sono altri dettagli che non vengono descritti per non perdere tempo e riguardano alcuni fattori di trascrizione che vengono regolati da eventi di fosforilazione dipendenti per esempio dalla chinasi Ca-dipendente o dalla PKC che attraverso un'altra protein chinasi possono regolare la fosforilazione di questo inibitore che in forma fosforilata migra dal nucleo al citoplasma; quindi fa un viaggio opposto e viene ancorato dalle proteine 14-3-3.

Come era già stato accennato, questo fenomeno permette l'attivazione di un complesso di trascrizione che è importante in questo contesto.

(Diapositiva 39, Lez 10)

L'ipertrofia cardiaca è solo una delle manifestazioni patologiche che interessano il muscolo cardiaco e scheletrico.

Tornando alla patologia cellulare, c'è un capitolo che riguarda la patologia dell'apparato contrattile, quindi delle proteine del citoscheletro, in tutte le cellule, in particolare le proteine contrattili del tessuto muscolare vero e proprio.

(Diapositiva 40, Lez 10)

Questa è una diapositiva tratta dalla rassegna che il prof Berton metterà su e-learning, ma non è da memorizzare.

È un elenco di tutte le proteine strutturali importanti nella funzione del muscolo cardiaco e scheletrico, che evidenzia come sono state identificate le lesioni*?(non sono sicura della parola lesioni, ndr)* dei geni codificanti per queste proteine che portano a diverse patologie, per esempio dilatative, ipertrofiche ecc.

Negli ultimi anni si è scoperto l'importanza della genetica delle patologie cardiache, cioè il fatto che molte proteine strutturali sono importanti per mantenere una certa funzione.

(Diapositiva 41, Lez 10)

Questo vale in particolare per il muscolo scheletrico, il quale è sottoposto ad uno stress continuo rappresentato dall'alternanza di eventi di contrazione e rilasciamento che può avere ripercussioni sulla struttura e permeabilità della membrana plasmatica della cellula muscolare sia scheletrica che cardiaca, che è rinforzata da complessi multimolecolari. Questi complessi sono costituiti di distroglicani e sarcoglicani che conferiscono una notevole rigidità e resistenza al danno, alla membrana delle cellule muscolari.

Questi complessi proteici membranari sono associati ad una serie di proteine che sono presenti nel sarcoplasma tra cui la più particolare è la **distrofina**, la quale è una proteina ad altissimo peso molecolare che si associa sulla faccia interna della membrana plasmatica a questi complessi multiproteici.

(Diapositiva 42, Lez 10)

La mancanza di questa proteina ha effetti drammatici sulla struttura del muscolo. Si vedono infatti delle progressive alterazioni delle fibre muscolari. C'è un aumento delle componente fibrosa che sostituisce fibre che vanno incontro poi a fenomeni apoptotici; quindi c'è una sostituzione connettivale e una caratteristica ridistribuzione dei mitocondri nelle zone periferiche delle fibre muscolari stesse.

Come si vede dalla colorazione con anticorpi specifici anti-distrofina, la localizzazione della proteina è posta sulla faccia interna della membrana plasmatica. Nelle distrofie muscolari invece gli anticorpi non evidenziano la presenza di distrofina.

(Diapositiva 43, Lez 10)

Le **distrofie muscolari** più importanti sono quella di **Duchenne** e quella di **Becker** e sono trasmesse con meccanismo X-linked. Il gene alterato è quello che codifica per la distrofina.

La differenza tra queste due forme è che nel caso di Duchenne c'è un'alterazione maggiore della trascrizione del gene quindi la quantità di distrofina è bassissima, come si vede dalla diapositiva precedente.

Nella distrofia di Becker invece ci sono delezioni o una serie di mutazioni puntiformi che alterano la funzione strutturale della proteina *(distrofina ndr)*, cioè la sua interazione con i complessi descritti prima. Però in questo caso è presente un po' di proteina.

Quindi la differenza fondamentale tra queste due patologie è l'insorgenza e la gravità.

(Diapositiva 44, Lez 10)

Questi sono dettagli che il prof non chiede e riguarda il fatto che negli ultimi anni sono state riclassificate le distrofie muscolari, andando ad identificare tutta una serie di geni alterati in queste diverse forme di distrofie che possono comportare alterazioni di un numero limitato di muscoli quindi con sintomi non particolarmente gravi.

Vi sono componenti di questo sistema complesso di stabilizzazione della membrana plasmatica ma ci sono anche altre proteine per esempio che fanno parte della membrana nucleare.

(Diapositiva 45, Lez 10)

Qui ci sono alcuni dettagli delle distrofie trattate nella diapositiva precedente

LEZIONE 11

Recettori accoppiati a proteine G trimeriche

(Diapositiva 2, Lez 11)

Una via particolare attivata da questi recettori *(accoppiati a proteine G trimeriche, ndr)* è la via βγ-dipendente.

La subunità βγ attiva la fosfolipasi Cβ e quindi tutti i turnover dei fosfoinositidi, la liberazione *(non sono sicura della parola liberazione ndr)* del calcio e l'attivazione di protein chinasi C, attraverso la formazione di diacilglicerolo.

Oltre alla fosfolipasi Cβ fosfoinositide-specifica, la subunità βγ attiva anche una particolare isoforma di fosfatidilinositolo-3-chinasi che viene chiamata isoforma γ che fa parte delle fosfatidilinositolo-3-chinasi di tipo 1B.

Quindi le isoforme 1A sono attivate del segnale di fosforilazione in tirosina, mentre l'isofoma 1B o fosfatidilinositolo-3-chinasi γ (per il momento è stata caratterizzata solo questa) è attivata dalla subunità βγ dei recettori accoppiati a proteine G trimeriche.

(Diapositiva 3 Lez 11)

Questa fosfatidilinositolo-3-chinasi forma PIP3 a partire da PIP2; questo enfatizza il fatto che la subunità catalitica ha un peso molecolare diverso rispetto a quello delle subunità catalitiche delle isoforme 1A.

Questa fosfatidilinositolo-3-chinasi è implicata in diverse risposte biologiche, per esempio la stessa ipertrofia cardiaca a partire da ligandi per il recettore accoppiato a proteine G trimeriche, come l'endotelina e l'angiotensina; inoltre è stato enfatizzato il suo ruolo in cellule leucocitarie, in particolare nel fenomeno del reclutamento di cellule leucocitarie.

(Diapositiva 4, Lez 11)

Questo disegno fa vedere come stimolando una cellula della linea mieloide con un chemoatrattante, si osserva un'aumentata formazione di PIP3 al di sotto della membrana plasmatica, il quale recluta delle proteine con un dominio PH, le quali sono in grado di attivare a loro volta molecole che regolano il riarrangiamento del citoscheletro e quindi il movimento cellulare.

Queste molecole sono rappresentate da una famiglia particolare di GTPasi cioè le Small GTP binding proteins che appartengono alla famiglia Rho.

In molte patologie infiammatorie si osserva un non-reclutamento dei leucociti in molti distretti, questo vale in particolare per i neutrofili e per i monociti che poi rilasciano molecole che sono alla base del danno tessutale come i radicali dell'ossigeno, enzimi litici e citochine che amplificano tutto il processo.

Ovviamente questo fenomeno del reclutamento è molto studiato nel contesto di nuove strategie farmacologiche per il controllo dell'infiammazione.

(Diapositiva 5, Lezione 11)

È mostrata la distribuzione di diverse molecole in una cellula che si muove e che quindi assume quella forma che viene definita polarizzata, in cui c'è un leading edge cioè un fronte principale della direzione del movimento (l'asterisco indica il punto in cui viene messo il chemoattrattante che appunto stimola il movimento cellulare verso la direzione).

Si è visto che sia il legame di un probe contenente un dominio PH e che quindi viene usato come indice di formazione del PIP3, sia la fosfatidilinositolo-3-chinasi γ sono maggiormente concentrate al di sotto della membrana plasmatica e quindi governano questo processo di movimento. Il PIP3 è più difficile da vedere in tecniche dirette di fluorescenza, comunque maggiore è la quantità di fluorescenza e maggiore è la quantità di PIP3 al di sotto della membrana plasmatica che lega la proteina contenente un dominio PH fluorescente.

(Diapositiva 6, Lez 11)

Questo è stato visto anche con altri approcci: se viene alterata l'espressione della fosfatidilinositolo-3-chinasi oppure al contrario si fà un knockout di una fosfatasi come la SHIP-1, si verifica che le cellule perdono questa situazione di polarizzazione, cioè non hanno più un leading front ma sono tendenzialmente rotondeggianti e per esempio nel caso della mancanza della fosfatasi, si vede che è come se la cellula cercasse di emettere lamellopodi in tutte le direzioni con la conseguenza netta che si arresta.

Quindi questa polarizzazione dei segnali è molto importante nella regolazione del movimento cellulare. Non conta il segnale in sé ma conta la distribuzione all'interno della cellula, in un particolare distretto.

(Diapositiva 7, Lez 11)

Una qualsiasi cellula che si muove ha un **fronte** lungo il quale avvine la direzione del movimento, una **coda** chiamata anche uropodo e un **centro** nel quale sono concentrate le zone pesanti, quindi tutti gli organelli (nucleo, ecc.).

Un fenomeno centrale di questo complesso processo biologico è rappresentato dalla polimerizzazione dell'actina al leading front, in questo modo si formano dei filamenti di actina che spingono la membrana al leading front in una determinata direzione

Inoltre la cellula deve alternare momenti di adesività alla superficie lungo cui si muove, per esempio il lamellopodio una volta che si forma al leading front è staccato dal substrato ma deve riattaccarsi per consentire lo spostamento della cellula in avanti.

Quindi abbiamo la polimerizzazione dell'actina al leading front, il turnover di adesioni che per esempio è molto importante nella coda dove ci deve essere un distacco di queste interazioni adesive per favorire uno spostamento delle cellule in avanti e infine abbiamo al centro della cellula dei fenomeni di contrazione acto-miosinica che sono importanti per spostare tutto il peso in avanti.

Questi eventi devono essere coordinati, distribuiti in regioni diverse e quindi l'intreccio tra i segnali che regolano una cosa e certe volte una cosa opposta in un altro punto è particolarmente difficile da studiare.

(Diapositiva 8, Lez 11)

La polimerizzazione dell'actina che avviene al leading front è stata accomunata al funzionamento di un tapis roulant; infatti l'actina viene aggiunta nella zona del filamento più sotto alla membrana plasmatica, mentre nella parte più distante della membrana plasmatica esistono dei fenomeni di turnover della polimerizzazione che consentono il rilascio di molecole di G-actina cioè di actina solubile nel citosol non filamentosa, la quale viene poi utilizzata per essere riaggiunta al di sotto della membrana della cellula che si muove.

Ci sono diverse proteine che regolano questo fenomeno e un altro importante aspetto della regolazione è rappresentato dal fatto che si formano dei filamenti con un angolo ripetuto di 70° dal filamento principale, i quali aumentano l'efficacia di spinta verso la membrana plasmatica e quindi la formazione del lamellopodio.

(Diapositiva 9, Lez 11)

In termini di signaling che porta allo sviluppo del movimento cellulare, ci sono una serie di recettori che generano una serie di segnali che convergono nell'attivazione dalla famiglia di GTPasi Rho.

Le Rho GTPasi regolano diversi fenomeni, in particolare la polimerizzazione dell'actina ed anche la contrattilità acto-miosinica che è importante per spostare il peso degli organelli cellulari in una certa direzione. Questi recettori utilizzano enzimi, adattatori e regolatori che portano all'attivazione di una serie di GEFs che attivano le Rho GTPasi e queste regolano una serie di proteine che sono importanti nella nucleazione e nel taglio dei filamenti di actina e nella interazione acto-miosinica.

(Diapositiva 11 Lez 11)

Questa complessa serie di eventi che in una cellula che si muove è coordinata da meccanismi solo in parte conosciuti, è stata esemplificata studiando questa famiglia di Rho GTPasi che vengono regolate da GEF che scambia il GDP con il GTP.

(Diapositiva 12 Lez 11)

Alcune famiglie di Small GTP binding proteins e loro funzioni principali.

Abbiamo viso Ras e Rho.

Rab è da ricordare nel contesto della fusione vescicolare che comporta l'aumentata espressione di GLUT-4 sulla membrana di cellule responsive all'insulina.

(Diapositiva 13 e 14, Lez 11)

Il modello che è emerso nel corso degli anni è rappresentato dal fatto che questa famiglia di Rho GTPasi che è composta da tre membri principali: Cdc42, Rac e Rho svolgono una funzione selettiva nell'organizzazione di determinate forme di polimerizzazione dell'actina.

Il primo riquadro rappresenta la forma di polimerizzazione che viene chiamata anche **fillopodio**, che è costituita da un'evaginazione più o meno lunga della membrana plasmatica all'interno della quale si trovano filamenti di actina e assenza totale di organelli.

La seconda forma di polimerizzazione che caratterizza il leading front di una cellula in movimento, è costituita dal **lamellopodio**. Spesso i lamellopodi si formano tra due fillopodi, quindi inizialmente la cellula emette in due punti diversi due fillopodi e tra questi due incomincia a formarsi il lamellopodio. C'è una stretta correlazione tra il Cdc42 e Rac che favorisce questo fenomeno.

La Rho ha invece la funzione di regolazione delle **stress fibers**, cioè organizza dei fasci di actina nei punti di adesione e quindi da questo punto di vista si oppone ad un efficace movimento; però questa affermazione viene mitigata dal fatto che questa GTPasi è importante nei fenomeni di contrattilità acto-miosinica. Quindi l'attivazione di Rho è importante al centro della cellula perché consente lo spostamento degli organelli intracellulari.

(Diapositiva 15, Lez 11)

L'aggregazione piastrinica è stimolata in primo luogo dall'adesione che induce il rilascio di aggreganti. L'adesione direttamente o gli aggreganti endogeni generati dai processi adesivi, attivano l'integrina $\alpha IIb\beta 3$ consentendo così il legame del fibrinogeno e quindi l'aggregazione primaria, ma è la secrezione dei granuli alfa che è essenziale per la stabilizzazione dell'aggregazione.

Sia gli aggreganti endogeni che quelli esogeni sono molecole che reagiscono con recettori accoppiati a proteine G trimeriche.

(Diapositiva 16, Lez 11)

Trombina, PAF, tromboxano A2 e ADP sono gli aggreganti endogeni e vengono tutti riconosciuti da recettori accoppiati a proteine G trimeriche.

Questo ha stimolato ricerche per comprendere vie di attivazione della reattività piastrinica che possono essere controllate con una appropiata farmacologia.

Uno degli aggreganti endogeni generato dalle piastrine in risposta all'adesione, è un derivato dell'acido arachidonico che è il tromboxano A2. La quantità di tromboxano sintetasi che è l'enzima limitante la produzione di tromboxano è estremamente elevata all'interno di queste cellule, quindi da un precursore comune che è l'acido arachidonico, attraverso l'azione della ciclossigenasi, vengono formati dei precursori che possono formare poi diverse molecole a seconda degli enzimi che vengono espressi in diversi tipi di cellule.

(Diapositiva 17, Lez 11)

L'aspirina e altri FANS cioè farmaci antinfiammatori non steroidei, sono inibitori della ciclossigenasi, più precisamente sono inibitori delle ciclossigenasi perché ne esistono diverse isoforme. Il risultato netto dell'inibizione della ciclossigenasi da parte dell'aspirina è rappresentata da una marcata riduzione della produzione di tromboxano da parte delle piastrine e una inibizione significativa del processo di aggregazione.

L'inibizione della ciclossigenasi da parte dell'aspirina è irreversibile, infatti l'acido acetilsalicilico acetila la ciclossigenasi inattivandola. Di conseguenza un eventuale sanguinamento determinato da una eccessiva assunzione di aspirina, continua anche

dopo la sospensione dell'assunzione del farmaco, perché richiede la foemazione di piastrine nuove a livello midollare che non abbiano la ciclossigenasi inibita.

Gli altri farmaci antinfiammatori non steroidei sono invece inibitori competitivi, quindi la diluizione del farmaco comporta una rapida reversibilizzazione dell'effetto inibitorio nell'arco di 12 ore.

Quindi in situazioni di rischio di sanguinamento, l'aspirina non và usata.

(Diapositiva 18, Lez 11)

Un particolare da sottolineare è che l'aspirina è un inibitore che agisce sia su COX 1 che su COX 2. La COX 2 è un'isoforma di ciclossigenasi di tipo infiammatorio. Il gene per la COX 2 è indotto durante il processo infiammatorio da una serie di citochine che ne favoriscono la trascrizione.

L'aspirina e i FANS hanno una serie di effetti collaterali di cui il sanguinamento è il più raro apparte in certi casi, però molto più importanti sono per esempio le alterazioni a livello della mucosa gastrica.

A questo proposito c'è stata una corsa a trovare farmaci che inibissero selettivamente la COX 2 per evitare questi effetti collaterali. Questi farmaci ad un certo punto sono stati ridimensionati nel loro uso e nei loro effetti per il fatto che l'uso di questi farmaci ha evidenziato un aumento del rischio di lesioni trombotiche anche con conseguenze cliniche importanti.

La COX 2 che è la ciclossigenasi infiammatoria sicuramente indotta anche in cellule della linea mieloide come monociti, macrofagi ecc., è inoltre costitutivamente espressa dalle cellule endoteliali, le quali utilizzano prevalentemente COX 2 per metabolizzare l'acido arachidonico con produzione di prostacicline, in quanto hanno una grande quantità di prostaciclin sintetasi.

La prostaciclina è un potente inibitore dell'aggregazione piastrinica; quindi bloccando la COX 2 viene bloccata la produzione di prostaciclina, cioè uno dei freni ad una eccessiva aggregazione piastrinica.

Con i FANS e l'aspirina si blocca sia COX 1 che COX 2, però il bilancio netto è verso un'inibizione delle funzioni trombossano-dipendenti cioè le funzioni proaggreganti del trombossano.

Come sottolineato da un editoriale sulla rivista Science, è meglio assumere l'aspirina rispetto agli inibitori della COX 2, soprattutto per pazienti con rischio di occlusione coronarica dovuta alla presenza di placche aterosclerotiche.

(Diapositiva 19, Lez 11)

Come già detto, tutti gli stimolanti della aggregazione pistrinica, sono riconosciuti da recettori accoppiati a proteine G trimeriche.

Alcuni di questi aggreganti piastrinici, ad esempio l'ADP, il trombossano A2 e la trombina si legano a recettori che sono accoppiati a diversi sistemi di trasduzione.

Sembrerebbe quindi che la farmacologia della inibizione della funzione piastrinica, sia quasi impossibile da percorrere, in quanto sembra esserci una enorme ridondanza nei sistemi che portano alla stimolazione dell'aggregazione pistrinica.

(Diapositiva 20, Lez 11)

Queste diverse vie segnalano attraverso:

- **Gαi** che determina la riduzione del cAMP e l'attivazione sia di fosfolipasi che di PI3kγ, attraverso la subunità βγ.
- **Gαq** che determina il turnover dei fosfoinositidi.
- **Gα12/13** che attiva Rho, le tirosin chinasi citoplasmatiche e secondariamente la fosfolipasi C γ.

In realtà, l'enorme ridondanza della segnalazione che porta alla aggregazione piastrinica è stata poi ridimensionata, perché è emerso che queste diverse vie più che essere ridondanti sono integrate e tutte concorrono all'efficace completamento dell'aggregazione irreversibile e stabile delle piastrine cioè della formazione del tappo piastrinico.

Questa osservazione sta alla base della percorribilità della farmacologia, nel senso che l'inibizione di una di queste vie è di per sé in grado di inibire significativamente la risposta delle piastrine.

(Diapositiva 21, Lez 11)

Vi sono una serie di molecole che inibiscono l'aggregazione pistrinica in forme fisiologiche e riguardano per esempio la prostaciclina, la quale viene riconosciuta da recettori accoppiati a proteine G trimeriche e i segnali convergono nell'attivazione dell'adenilato ciclasi con aumento del cAMP.

L'aumento del cAMP è un fenomeno che si accompagna sempre ad alterazione dell'attivazione dell'integrina αIIbβ3 e al riarrangiamento del citoscheletro, che è importante nel fenomeno di aggregazione.

La stessa cosa vale per il cGMP che è aumentato dall'ossido di azoto, il quale rappresenta uno dei meccanismi di inibizione da parte dell'endotelio integro dell'aggregazione piastrinica in condizioni fisiologiche.

Questi nucleotidi ciclici vengono degradati da fosfodiesterasi specifiche e tra l'altro vi è una farmacologia in espansione sugli inibitori delle fosfodiesterasi che possono mantenere più alto il livello di questi nucleotidi ciclici, inibendo così il processo di aggregazione.

(Diapositiva 22, Lez 11)

Il recettore per l'ADP è un importante bersaglio farmacologico; i farmaci competono con l'ADP per il suo recettore e bloccano l'aggregazione piastrinica.

L'ADP è importatnte sia per l'aggregazione primaria e quindi per l'attivazione dell'integrina αIIbβ3, che per l'aggregazione secondaria cioè per il rilascio di quelle molecole adesive che abbiamo visto stabilizzano l'aggregato piastrinico.

Cia sono anche dei nuovi farmaci come il prasugrel, che è più efficace del clopidogrel nel bloccare la stimolazione ADP-dipendente.

Il tromboxano viene riconosciuto da diversi recettori; ovviamente il sistema più semplice per inibire l'azione del tromboxano è inibire la sua produzione da parte delle piastrine invece di agire sull'interazione ligando-recettore e quindi l'aspirina o altri FANS agiscono inibendo la ciclossigenasi.

La formazione della trombina è inibita da tutti quei farmaci che alterano il processo coagulativo, compresi i classici cumarinici come il coumadin, i quali bloccano la formazione della trombina ma sono anche degli inibitori selettivi dell'azione della trombina che mantengono inalterate le prime fasi della coagulazione.

(Diapositiva 23, Lez 11)

Lo spegnimento della trasduzione del segnale si realizza atrraverso diversi meccanismi.

Uno riguarda il sistema di trsduzione vero e proprio, dovuto all'attività intrinseca GTPasica della subunità α, che quindi determina una riassociazione del complesso αβγ e poi c'è un meccanismo a carico del recettore che porta ad una internalizzazione del recettore stesso in un comparto vescicolare in cui và anche incontro a processi di degradazione. Questo fenomeno che spiega come mai la prolungata esposizione a ligandi, per molti di questi recettori comporti una diminuita espressione del recettore stesso sulla superficie.

Questo fenomeno è stato accennato quando si è parlato del meccanismo endogeno di difesa contro una prolungata stimolazione β-adrenergica che comporta la diminuzione dell'espressione dei recettori β-adrenergici per esempio delle cellule muscolari e cardiache.

I recettori per essere internalizzati, devono essere precedentemente fosforilati; la fosforilazione non è mediata solo da chinasi specifiche per recettori accoppiati a proteine G trimeriche, ma anche da altre chinasi come la PKA e la PKC che possono agire con un meccanismo di feedback negativo, fosforilando la porzione citoplasmatica del recettore, il quale nella forma fosforilata è in grado di legare la β-arrestina.

(Diapositiva 24, Lez 11)

La β-arrestina è stata chiamata così per la sua capacità di arrestare l'evento segnalante ma fa anche altre cose come ad esempio legare una serie di proteine segnalanti comprese chinasi della famiglia Src e tutta una serie di MAP chinasi che poi portano all'attivazione di altre MAP chinasi.

Per cui è emerso che questi recettori trasducono segnali con una temporalità diversa: nella prima fase predominano segnali classici determinati dall'attivazione delle fosfolipasi, adenilato ciclasi ecc., ma prima dell'internalizzazione vengono attivati anche altri segnali che hanno importanza in contesti che il prof non affronterà.

LEZIONE 12

Tirosin chinasi citoplasmatiche

Le tirosin chinasi citoplasmatiche sono molto importanti nel contesto della trasduzione del segnale da parte dei recettori, che da un certo punto di vista sono recettori catalitici non perché abbiano un'attività enzimatica intrinseca ma perché associano alla coda citoplasmatica degli enzimi soprattutto quelli ad attività tirosin chinasica.

Le tirosin chinasi si dividono in tirosin chinasi recettoriali, che sono quelle viste nel contesto dei recettori per i fattori di crescita e tirosin chinasi citoplasmatiche.

(Diapositiva 2, Lez 12)

Sono riportate le tirosin chinasi citoplasmatiche più caratterizzate.

Esse sono caratterizzate da specifici domini che sono differenti da una chinasi all'altra.

Il dominio SH1 cioè Src Homology 1 è quello più conservato infatti è molto simile tra le diverse chinasi in quanto deve fosforilare i residui di tirosina.

Le **Tec** sono delle chinasi espresse prevalentemente nelle cellule del sistema emopoietico; oltre ai canonici domini SH2 ed SH3, hanno un dominio PH e quindi fanno parte delle vie di trasduzione del segnale che dipendono dalla formazione del PIP3. Il legame al PIP3 favorisce l'attivazione di queste chinasi e l'interazione con specifici substrati.

Un'altra chinasi è in realtà una famiglia costituita da due membri *(il secondo membro non è stato descritto dal prof, ndr):* **FAK** che stà per focal adhesion kinase che è presente nelle adesioni focali, le quali sono siti in cui le integrine che riconoscono le molecole della matrice extracellulare, clusterizzano cioè si concentrano e organizzano la polimerizzazione dell'actina e l'interazione con diverse proteine citoscheletrice, al di sotto della coda citoplasmatica delle integrine.

Un'altra famiglia di cui parlerà il prof. Cassatella è quella delle **Jak** cioè Janus Kinase dalla divinità bifronte della cultura greca, proprio perché hanno due domini chinasici oltre ad avere un dominio SH2.

Src è il capostitpite degli studi sulle tirosinchinasi citoplasmatiche infatti la terminologia usata per descriverle si deve al sequenziamento del gene Src e all'identificazione di una serie di domini che vengono chiamati Src Homology o SH1, SH2 ed SH3.

Ci sono almeno 8 membri della famiglia che sono espressi in termini differenziali in molti tipi di cellule. Le cellule ematopoietiche esprimono elevati livelli di alcuni membri dlla famiglia Src. Un'altra caratteristica strutturale importante di Src è che all'N terminale presenta dei residui amminoacidici che alcuni chiamano SH4, cioè Src Homology 4. I residui comprendono una metionina all'N terminale alla quale può essere attaccato un residuo di acido miristico; in altre parole i membri della famiglia Src ma anche un'altra famiglia di tirosin chinasi che vedremo, vengono acilati con un acido grasso.

Nel caso di Src si tratta solo di acido miristico mentre nel caso di altri membri di questa famiglia, ci sono dei residui di cisteina all'N terminale che consentono l'attacco di acido palmitico.

Questi residui di acidi grassi sono importanti per distribuire queste chinasi sulla faccia interna della membrana, in quanto incastrandosi tra gli acidi grassi dei fosfolipidi fanno da ancora.

Un'altra famiglia di chinasi è la **ZAP70/Syk**. Hanno la caratteristica particolare di avere due domini SH2 mentre non hanno un dominio SH3.

Infine c'è la famiglia **Abl/Arg** con struttura molto simile alle Src: la sequenza dei domini SH1, SH2 ed SH3 è simile ed inoltre hanno anch'esse un residuo di acido miristico all'N-terminale. La differenza fondamentale è al C-terminale: Abl e Arg hanno una lunga sequenza C-terminale che contiene una serie di siti di interazione con proteine del citoscheletro o che comprendono anche delle sequenze che consentono la localizzazione nel nucleo di un'aliquota di Abl o Arg.

(Diapositiva 3, Lez 12)

Gli studi su Src iniziarono nel 1911 alla Rockefeller University, dove il ricercatore Francis Rous descrisse per la prima volta un fenomeno particolare e cioè l'esistenza si un tumore trasmissibile e separabile da un animale all'altro.

Rous era a conoscenza che nello stabulario dell'università c'erano dei polli che sviluppavano un sarcoma la cui diffusione aveva caratterisriche epidemiche, in quanto gli animali sembravano passarsi questo tumore dall'uno all'altro. Nelle riviste dell'epoca non si considerava ancora che un tumore potesse essere trasmissibile ma Rous riuscì a dimostrare che prendendo cellule

neoplastiche da questi polli, rompendole e filtrando in modo da escudere qualsiasi cellula e qualsiasi batterio, era possibile indurre la trasformazione neoplastica iniettando il filtrato in un pollo o in cellule in coltura.

(Diapositiva 4, Lez 12)

Questo tipo di osservazione non suscitò alcun interesse, ma venne ripresa in considerazione a partire dagli anni 60' e fu la base per la scoperta degli oncogeni.

In questa tabelle sono presenti alcune tappe fondamnetali di queste scoperte.

La scoperta del Src è importante perché ha a che fare con le ricerche sulla struttura genomica dei retrovirus. I retrovirus hanno una polimerasi inversa e quindi possono copiare una sequenza di DNA a partire da RNA che può essere inserita del DNA della cellula ospite.

(Diapositiva 5, Lez 12)

A partire dagli anni 70' fu possibile sequenziare il virus che precedentemente era stato dimostrato essere in grado di trasmettere il sarcoma e si osservò la presenza di un gene aggiuntivo che venne chiamato Src da sarcoma, rispetto alle regioni geniche che erano già state caratterizzate nei retrovirus.

Queste regioni sono: **gag** che trascrive geni implicati nella sintesi di proteine del capside; **pol** che trascrive per la polimerasi inversa ed **env** che trascrive per geni che vengono inseriti nella membrana plasmatica della cellula ospite prima del fenomeno di budding in cui il virus si porta via un mantello rappresentato dalla membrana della cellula ospite più le proteine che il virus ha inserito e che sono importanti nell'interazione con altre cellule.

Il fatto che il virus che determinava il sarcoma nel pollo avesse un altro gene suscitò un grandissimo scalpore, perché fu la prima evidenza che un gene poteva indurre una trasformazione neoplastica.

Andando a vedere se vi erano sequenze simili nel DNA di diverse specie, si osservò che il gene Src aveva un corrispettivo nel DNA dalla Drosophila all'Uomo e quindi è un gene estremamente conservato. Questa scoperta introdusse il concetto che potevano esserci nel genoma delle cellule eucariotiche, dei geni in grado di codificare per proteine che se alterate potevano determinare la trasformazione neoplastica. Quindi si arrivò al concetto di oncogene e di trasformazione neoplastica.

Un aspetto importante di questi studi è che andando a paragonare la struttura del v-Src rispetto al c-Src, la differenza era veramente molto piccola. In particolare, il v-Src cioè il gene inserito nel genoma virale del virus che induce il sarcoma, era troncato al C-terminale ed era mancante di un numero molto limitato di aminoacidi.

(Diapositiva 6, Lez 12)

Analizzando questa differenza si scoprì una cosa che ha a che fare con la regolazione intrinseca di Src ma anche di molte altre molecole, che è basata su interazioni intramolecolari.

Nel disegno, a sinistra : in condizioni basali la tirosina in posizione 527 *(Y 527, ndr),* è riconosciuta dal dominio SH2 di Src. Questa interazione, consente un altro tipo di interazione tra il dominio SH3 e quello che riconosce il dominio SH3 che è rappresentato da una sequenza ricca nell'amminoacido prolina. In questa conformazione chiusa, Src è estremamente poco attivo; se viene rimossa questa tirosina, Src assume una posizione linearizzata. Scr è un enzima che si autofosforila ad esempio nella tirosina del dominio chinasico e in questo modo abbiamo il Src attivo.

Quindi la differenza fondamentale tra il v-Src ed il c-Src, è che il v-Src privo della coda citoplasmatica era costitutivamente attivo e quindi è in grado di fosforilare una serie di substrati che sono importanti per l'acquisizione del fenotipo neoplastico.

Nella parte centrale del disegno sono rappresentati i modi in cui Src può essere attivato. Uno di questi è paradossale, nel senso che è mediato da tirosinfosfatasi, le quali erano state viste all'inizio di questi studi come enzimi che inibivano i segnali ma in realtà sono emerse delle fosfatasi che stimolano la trasduzione del segnale proprio perché defosforilano la tirosina contribuendo ad aprire la struttura di Src.

Sono state identificate anche delle chinasi che sono in grado di fosforilare questa tirosina e quindi di spegnere la funzione di Src.

(Diapositiva 7, Lez 12)

Altri meccanismi alterano le interazioni SH3-dipendenti oppure competono per l'interazione tra SH2 e fosfotirosina.

Nella diapositiva sono presenti alcuni esempi:

- Il recettore per i fattori di crescita legando Src attraverso il dominio SH2, ne favoriscono lo stato attivo.
- La β-arrestina dei recettori accoppiati a proteine G trimeriche invece, lega Src attraverso il dominio SH3
- Le integrine attraverso il legame con FAK attivano Src mediante il riconoscimento di fosfotirosine in FAK.
- La catena β delle integrine può legare direttamente Src o membri della famiglia di Src attraverso un interazione mediata dal dominio SH3.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 27/11/2012

EnricoPriorâ€‹â€‹â€‹â€‹â€‹â€‹â€‹â€‹â€‹â€‹ 27/11/2012

prof. Cassatella

SISTEMI POLIMOLECOLARI SOLUBILI

I Sistemi polimolecolari solubili nel plasma e nell’interstiziocomprendono quattro fattori [credo intenda dire che i sistemipolimolecolari solubili sono quattro, ndr]:

-Sistema delle Chinine

-Sistema della Coagulazione

-Sistema della Plasmina

-Sistema del Complemento â€‹â€‹â€‹

Questi sistemi sono composti da componenti che si attivano in maniera sequenziale a cascata, in quanto normalmente esistono come precursori di enzimi, ovvero come proenzimi, che quando si attivano acquisiscono attività proteasica, diventando quindienzimi attivi che vanno a attaccare bersagli proteici riconosciuti dalla sequenza tipica dell’enzima che si attiva; questi bersagli in genere sono componenti a valle che vengono a loro volta degradati, rilasciati, attivati con enzimi e così via.

Sono quindi dei sistemi che si attivano sequenzialemnte e ancheamplificano la risposta perché, come vedremo, quando si attiva un componente di uno qualsiasi di questi sistemi, questo componenteattivo o questo enzima attivo va a degradare anche i componenti che appartengono agli altri sistemi polimolecolari solubili. In questo modo quindi amplificano la riposta infiammatoria tramitela generazione di tutta una serie di mediatori che determinano il tipo di risposta infiammatoria.

IL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Questo sistema è molto importante perché rientra in quelli che sono definiti i meccanismi di immunità innata, che consiste in una serie di risposte naturali legate all'attivazione di diversi componenti cellulari e non cellulari. Immunità innata e infiammazione non sono proprio la stessa cosa, perché c'è un gap importantissimo fra le due, però per certi punti di vista sono la stessa cosa.

I componenti cellulari dell'immunità innata, includono un certo numero di leucociti, che tratteremo in dettaglio: i mastociti, i granulociti polimorfonucleati, gli eosinofili, i neutrofili, le celluleNK, i macrofagi, le cellule dendritiche e poi anche categorie miste, come le cellule T, possono entrare nell'immunità innata,come vedremo in seguito.

E poi ci sono una serie di componenti solubili, che includono il sistema del complemento e tutta un'altra serie di proteine solubili, fra cui le pentraxine, una famiglia di proteine della fase acuta con funzioni difenisne, le collettine, le ldl, le citochine e così via.

Poi ci sono tutta una serie di altre difese innate rappresentati dalledifese anatomiche, secrezione ghiandole, motilità ciliale e altri sistemi che contribuiscono a difendere e circoscrivere gli elementi patogeni in attesa che altri sistemi intervengano.

Le FUNZIONI DEL COMPLEMENTO, che si attiva nel contesto dell'immunità innata.

Questo genera una serie di risposte grazie ai mediatori che si formano e che sono importanti per la risposta infiammatoria, perl'uccisione dei microbi (fra cui anche i virus).

Quindi può uccidere i microbi direttamente, ad opera del mac, e poi è importante nel favorire la fagocitosi dei microbi grazie all'azione opsonizzante di alcuni frammenti che derivano dall'attivazione di questo sistema.

Questo sistema può inoltre interagire con l'immunità specifica.A tal proposito sta emergendo il fatto che questa divisione fraimmunità innata e specifica lascia un po' il tempo che trova,perché questi sistemi "si parlano", sono altamente interconnessi,l'uno favorisce e potenzia l'altro, e l'immunità specifica usa sistemi dell'innata per le proprie funzioni effettrici, ad esempioalcuni frammenti del complemento possono contribuire all'attivazione della produzione degli anticorpi, agendo sui linfociti B: Nella diapositiva si vedono le funzioni effettrici degli anticorpi prodotti dai linfociti B, un'espressionedell'imm.specifica; gli anticorpi riconoscono un antigene specifico contro il quale poi fanno tutta una serie di azionibiologiche importanti come meccanismo di difesa dell'immunitàspecifica, ma gli anticorpi, prodotti dai linfociti B, ovvero dall'immunità specifica, utilizzano anche il complemento peresplicare le loro funzioni effettrici. Questo è un esempio di cross talk, da una parte il complemento favorisce l'immunità specifica edall'altra l'immunità specifica utilizza il complemento per le proprie risposte effettrici.

LE VIE DI ATTIVAZIONE DEL COMPLEMENTO.

Oggi sappiamo che non sono solo le vie classica e alternativa, ma da qualche anno si sa che ci sono anche altre vie di attivazione, in particolare la via lectinica.

Le tre vie alla fine convergono, attraverso diversi componenti del sistema, per formare la C3 convertasi che attacca il C3, che rappresenta una via cruciale di convergenza: quando si attiva ilC3, parte una cascata comune che porta all'attivazione del C5 e poi alla formazione del membran attack complex, il MAC.

Quindi la funzione principale del complemento,indipendentemente dalla via di attivazione , è quella di formare ilMAC, che è una struttura che fa dei buchi che fanno entrare acqua e quindi alla fine determinano la morte per lisi osmotica della cellula.

Il MAC ricalca anche un sistema usato da alcune cellule, che hanno un sistema simile; queste cellule sono i linfociti T citotossici, che rilasciano le perforine, e le cellule NK, le cellule citotossiche dell'immunità innata. Queste uccidono cellule bersaglio in maniera specifica grazie a vari meccanismi, uno di questo è il rilascio delle perforine, che fanno dei buchi assemblandosi sulla cellula bersaglio, quindi è un sistema molto simile al MAC e, come questo, è solubile, acellulare e rappresentano entrambi dei sistemi di lisi cellulare.

Diapositiva che illustra tutti i sistemi proteici del complemento, che vanno saputi.

-

Via classica: si attiva quando il C1 si lega ad anticorpiformando così il C1-complesso, in particolare gli anticorpilegano una particella; gli anticorpi che attivano la via classica sono IgM e IgG soprattutto, ma non in fase solubile, che non possono essere legati dal C1, ma solo quando legano l'antigene, perché le IgM cambiano conformazione e quindi sono riconosciute dal C1, mentre le IgG devono essere legate(ce ne vogliono almeno due) per poter essere attaccate dalC1, che è il primo frammento.

Poi il C1 si attiva generando diversi componenti che attivano la via classica arrivando al C3 e C5 che sono la via terminale.

-

Via alternativa: mentre la via classica è attivata da anticorpi che formano immucomplessi, e quindi è legata all' immunità specifica, la via alternativa dal punto di vista evolutivo è la tappa prima, che si attiva quando il C3, che normalmente si attiva a bassi livelli, riconosce agenti patogeni in generale(gram negativi, l'lps, gram positivi, ecc.); Si attiva quindi quando si attacca a lla superficie dei batteri.

Il C3 lega agenti patogeni che non hanno sistemi di inattivazione del complemento, a differenza delle cellule normali [immagino intenda dire dell'ospite, ndr]. Quando si lega ai patogeni si attiva la cascata a valle e alla fine c'è l'attivazione del C5 e dunque la via terminale con laformazione del MAC.

-

Via delle lectine: è simile alla classica, nel senso che queste proteine, cioè MBL (Mannos Binding Lectin), ficolina ecc.,sono proteine della fase acuta: durante la rispostainfiammatoria di una certa entità, tra i vari mediatori che si producono ci sono alcune citochine che vanno ad agire a livello del fegato, che produce la gran parte delle proteine del sangue; il fegato viene quindi stimolato da queste citochine ad aumentare la produzione delle proteine della fase acuta, che sono decine, e servono a proteggere l'ospite del danno,soprattutto dall'infezione. Ciascuna di queste proteine fa cose diverse dalle altre. Queste proteine hanno struttura molto simile e riconoscono residui glucidici che sporgono dalla prete dei batteri e degli agenti patogeni, li riconoscono e reclutano enzimi e quindi alla fine la patway è molto simile a quella della via classica.

La differenza è che la via classica si attiva perché il C1 lega le IgG, invece nella via lectinica si attiva sempre la stessa cascata ma tramite riconoscimento diretto delle componentimicrobiche. Lo scopo è comunque sempre lo stesso, ovvero lisare i micorbi.

I pattern reconition receptor (PRR) sono recettori che riconoscono i PAMP, che sono pattern associati a patogeni. Questi PRR sono espressi particolarmente su cellule dell'immunitàinnata; quindi anche a livello dell'immunità innata ci sono sistemidi riconoscimento dei componenti dei patogeni che hanno unacerta specificità; grazie a questi PRR, le cellule riconoscono strutture specifiche e importanti per l'agente patogeno, spesso usate per la patogenesi e la proliferazione. Questa specificità non solo per quanto riguarda il riconoscimento delle cellule ma anche per quanto riguarda questi sistemi solubili [la frase non mi è chiara, ndr]

Quindi abbiamo attivazione del complemento quando carboidrati batterici sono riconosciuti dalla via lectinica; poi un'altrapossibilità di attivare il complemento è la sua attivazione da parte di enzimi che si generano quando si attivano altri sistemipolimolecolari solubili.

L’attivazione del complemento alla fine serve a formare il MAC ea lisare i batteri; inoltre per azione enzimatica succede che uncomponente inattivo viene degradato e da una parte si forma la molecola enzimatica attiva, dall’altra uno o più PRODOTTI DI DEGRADAZIONE, che non sono inerti ma al contrario sonomolto importanti perché responsabili di una serie di fenomeni che si verificano a livello dell’infiammazione.

Tabella sulla diapositiva elenca tutti i prodotti di degradazione,che sono tantissimi e hanno funzioni cruciali per la rispostainfiammatoria.

Alcuni di questi derivano dalla degradazione del C3 e del C5 , la cui degradazione produce frammenti biologicamente attivi, che sono il C3a, il C3b e il C5a: C3a C5a sono importanti per larisposta infiammatoria, C5b per la fagocitosi attraverso l’opsonizzazione.

C3a e C5a e anche C4a, quest’ultimo meno potente, hanno azione pro infiammatoria, in quanto stimolano i mastociti che rilascianoistamina e producono metaboliti dell’acido arachidonico. Attraverso quest’azione diretta sui mastociti e anche su altre cellule determinano alcuni fenomeni tipici della flogosi acuta, dell’angioflogosi, ovvero fenomeni vasoattivi, fenomeni chedeterminano un aumento della permeabilità e quindi la formazione di essudato (edema essudatizio) e contrazione della muscolatura liscia e quindi broncocostrizione e vasocostrizione sistemica gravissima che piò essere fatale.

Sono definite anafilotossine perché quando somministrate in grande quantità mimano gli effetti dello shock anafilattivo, quindi una grande broncocostrizione.

Quindi questi sono mediatori infiammatori che mimanol’angioflogosi, C5a durante la risposta infiammatoria acuta èprobabilmente il primo che si forma, ed è dimostrato che èresponsabile del reclutamento iniziale dei granulociti neutrofili prima delle chemochine; infatti solo successivamente sono prodotte le chemochine specifiche, invece questi mediatori aspecifici sono i primi ad essere prodotti.

Queste anfilotossine possono anche avere azione chemotattica, agendo su diverse cellule: neutrofili, monociti, cellule dendriticheecc. Hanno quindi un effetto molto specifico.

C3a e C5a agiscono su recettori che, come potete immaginare, appartengono ai recettori che attraversano sette volte la membranae agiscono quindi attraverso le TBP (Trimeric Binding Protein)[non sono sicuro di ciò, ndr] che sono quindi accoppiate alle proteine G.

Non servono solo al reclutamento dei leucociti, ma anche astimolare le risposte delle cellule, non solo il movimento ma anche le risposte effettrici.

Quindi C3a e C5a sono mediatori pro infiammatori importanti per la flogosi acuta.

Poi c’è l’importante azione da parte dei prodotti di derivazione delC3 che è quella di favorire la fagocitosi perché, come anche altri fattori, favoriscono l’opsonizzazione, che è un processo grazie alquale un determinato composto di lega alla superficie di un microbo e questo legame favorisce il riconoscimento da parte di una cellula, come un fagocita (che sono, i fagociti professionisti, imacrofagi, i neutrofili, le Cellule Dendritiche e basta, non ce ne sono altri, anche se poi possono esserci fagociti non professionisti.

I fagociti professionisti, grazie al riconoscimento della particella legata al microbo (ciò avviene grazie a un recettore, ad esempio quello per C3b) sono stimolate al processo della fagocitosi.

Quindi l’opsonizziazione è un processo che favorisce indirettamente il riconoscimento delle cellule che devono essere fagocitate. Ciò avviene perché questi recettori chericonoscono il fattore opsonizzante hanno la proprietà di stimolaresignalling che favorisce la fagocitosi.

Oltre al C3b e ai prodotti di derivazione del complemento ci sono anche tanti altri fattori ad attività opsonizzante, specie le IgG, che si legano ai batteri, ai loro antigeni, ricoprendo così i batteri; i fagociti hanno recettori specifici che riconoscono la coda, ovverola porzione fc delle IgG.

Invece i recettori che riconoscono i fattori opsonizzantiderivati dal sistema complemento sono i ComplementReceptor, CR (ex CR1), che riconoscono da una parte la porzionefc, e dall’altra C3b, e possono così legare il microbo opsonizzato;questi recettori sono in grado di attivare signalling specifico della fagocitosi e quindi cellula fagociterà il microbo grazie all’opsonizzazione.

Ci sono alcuni fagociti che possono fagocitare anche in assenza di fattori opsonizzanti: si può distinguere quindi fra una fagocitosimediata da fattori osponizzanti e una non mediata da fattori opsonizzanti; ovviamente quella con l’opsonizzazine. sarà più efficace.

Anche altri prodotti di degradazione del complemento possono favorire la fagocitosi, ex C3b, e i prodotti di degradazione di quest’ultimo, e sono noti i recettori che li riconoscono, il CR1, CR3 e il CR4. CR3 e CR4 hanno una struttura eterodimerica, e sono due integrine.

Altra azione importante riguarda LA CLEARANCE DELLE CELLULE APOPTOTICHE.

Alcune cellule, per vari motivi (per esempio per cambio tissutale o durante la fase risolutiva della risposta infiammatoria) possonomorire per apoptosi che è una morte silente. I corpi apoptotici (o cellule apoptotiche) che si formano devono essere eliminati, soprattutto dai macrofagi specializzati presenti in diversi tessuti.

i recettori implicati nel riconoscimento dei corpi apoptotici sono molti, alcuni di questi sono anche recettori che riconoscono frammenti del complemento. Quindi il complemento è anche coinvolto nel riconoscimento dei copri apoptotici da parte dei macrofagi.

La fagocitosi dei corpi apoptotici è molto diversa dalla fagocitosi dei microbi, perché è mediata da recettori in gran parte diversi, altre cose ancora non si conoscono bene.

Una caratteristica importante della fagocitosi delle celluleapoptotiche è quella di indurre la produzione, da parte di questi macrofagi, di mediatori anti infiammatori, NON infiammatori: infatti quando una cellula fagocita un microbo, oltre a eliminarlo, produce mediatori pro infiammatori. Invece se un fagocita “mangia” cellule apoptotiche produce mediatori anti infiammatori, come TGF-beta, IL-10.

Ci sono situazioni in cui c’è deficit ereditario o acquisito di questi componenti e quindi possono svilupparsi malattieautoimmuni, perché corpi apoptotici non fagocitati liberano all’esterno sostanze self che sono riconosciute come non self edeterminano quindi la creazione di anticorpi che col tempo possono generare patologia autoimmune.

RUOLO DEL COMPLEMENTO NELL’ATTIVAZIONE DEI LINFOCITI B

Un’altra azione di alcuni prodotti di derivazione del complemento,in particolare del C3b, è quella di legare il CR2 espresso su linfociti B; si forma così, insieme a CD19 e CD81 il corecettoredel B cell receptor che, quando attivato, stimola risposte del linfociti B.

CR2 è anche recettore per un patogeno, ovvero di EBV.

Quindi perché si attivi il linfocita B è necessario che si attivi anche il comlesso corecettoriale [non sono sicuro della frase, ndr]

Questo è un esempio di cross talk fra immunità innata e specifica: infatti i prodotti di degradazione del complemento potenziano larisposta dei linfociti B, che appartengono all’immunità specifica; ciò è simile a quello che avviene con

linfociti T che necessitano dicostimolazione per attivarsi in modo ottimale (CR2 è dunque una specie di molecola costimolatoria per i linfociti B).

Il complemento quindi non solo fa fuori i patogeni, ma i suoiprodotti di degradazione sono anche coinvolti in altre risposte, che riguardano l'infiammazione, il potenziamenti della risposta specifica, la fase di risoluzione della risposta infiammatoria e poi anche la clearance degli immunocomplessi circolanti.

Quando infatti si formano gli anticorpi alla fine dev'esserci, se ilprocesso arriva a buon fine, l'eliminazione degliimmunocompessi.<

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 28/11/2012

Lezione di Patologia Generale e Fisiopatologia del 28/11/2012
Prof. Cassatella

Sbobinatore: Chiara B. Santoro
Revisore: Sofia Corradin

Abbiamo visto ieri il sistema del complemento, con la produzione di vari prodotti di degradazione che ci interessano molto dal punto di vista della funzione, e i suoi sistemi di regolazione, che sono molto importanti. Abbiamo poi visto il sistema delle chinine (vedi schema sulle slides che aggiunge anche altre informazioni).
Innanzitutto il sistema delle chinine si attiva contemporaneamente al sistema della coagulazione, precisamente alla via intrinseca della coagulazione, quella dettata dall'attivazione del fattore XII o di Hageman, in quanto questo è attaccato alla precallicreina e quindi quando si attiva il fattore di Hageman si attiva anche il sistema delle chinine.

Il sistema delle chinine è infatti formato da una serie di precursori inattivi definiti chininogeni che quando sono degradati da una serie di enzimi, tra cui la callicreina, si attivano; il più studiato e conosciuto di questi enzimi è appunto la callicreina che si forma a partire dalla precallicreina. Si formano quindi una serie di mediatori, le chinine tra cui la più studiata e la più conosciuta (non necessariamente la più importante) è la bradichinina; questa, così come le altre chinine vengono poi rapidamente degradate da altri sistemi proteolitici.

(commenta una diapositiva) Questa diapositiva illustra un altro collegamento di questi sistemi: quello con il sistema della renina - angiotensina che è importante per la regolazione della (incomprensibile) - ci sono praticamente dei componenti in comune, dei componenti condivisi;

(commenta una diapositiva) Si tratta di un' altra diapositiva messa x ricordare grossomodo che la funzione biologica delle chinine, bradichina in particolare, sono le solite e sono cioè effetti importanti per la flogosi acuta:
- vasodilatazione;
- aumento della permeabilità vascolare;
- capacità di indurre o da sola o insieme altri fattori la produzione di mediatori chemioattrattori;
- la stimolazione dei nervi,
- la stimolazione della produzione di derivati dell' acido arachidonico;
- altre azione che possono poi essere implicate in funzioni omeostatiche oppure soprattutto patologiche in diverse patologie.

I SISTEMI DI CONTROLLO DEI SISTEMI POLIMOLECOLARI SOLUBILI

Come al solito questi sistemi hanno, come visto ieri, dei sistemi di controllo che sono nel plasma e nell'interstizio e sono praticamente degli inibitori di proteasi: sono cioè diverse categorie di molecole che inibiscono famiglie di proteasi e che hanno azione molto simile. La concentrazione degli inibitori nel plasma e nell'interstizio è molto più alta della concentrazione dei componenti dei vari sistemi e questo a illustrare l'importanza che ci deve essere per controllare in maniera molto fine e molto sottile questi ultimi di modo che questi non sbaglino perché se lo fanno si avranno diverse conseguenze a seconda dei casi.

Uno di questi inibitori è C1 inhibitor, visto ieri relativo alla via classica del complemento, che blocca e degrada l'attivazione del C1 (blocca e degrada il C1 ndr). E' implicato nella regolazione di vari livelli nel sistema della chinine (non solo! Ndr) (nella

diapositiva l’inibitore è illustrato con un box nero con delle righette bianche). Visto che la bradichina è importante, tra le varie cose, nell'aumento della permeabilità vascolare, la carenza dell’inibitore può determinare patologie ereditarie quali l'angioedema ereditario.

Questo C1 inhibitor è in grado di inibire anche la cascata della coagulazione come si vedrà più avanti.

Altri inibitori del sistema sono:
- ï • ¡2 macroglobina;
- antitrombina 3 (blocca trombina, vedremo più avanti).

Ripetendo le funzioni chinine, queste sono:
- vasodilatazione;
- aumento della permeabilità vascolare;
- dolore;
- capacità di indurre chemiotassi;
- (incomprensibile)
- (incomprensibile)

(le ultime due funzioni di questo elenco risultano incomprensibili dalla registrazione, immagino siano analoghe a quelle viste all’inizio della lezione e soprattutto saranno sicuramente riportate sulle slides, ndr)

IL SISTEMA DELLA COAGULAZIONE

Si ricordi che l’attivazione chinine è collegata strettamente all'attivazione del fattore di Hageman, coinvolto anche nell'attivazione della via intrinseca della coagulazione e quindi ancora una volta si ribadisce come questi due sistemi siano strettamente correlati; il sistema della coagulazione è poi ulteriormente collegato tramite formazione del coagulo con il sistema della plasmina.

Il sistema della coagulazione è il terzo sistema polimolecolare solubile del plasma: esso si attiva nel momento in cui si ha un danno vascolare, tissulare, situazione in cui si ha sempre, a grandi linee, esposizione di cariche negative; a seconda del tipo di attivazione in vitro (che ha delle ripercussioni anche in vivo) presenta due vie di attivazione: la via intrinseca e la via estrinseca:

a) la via INTRINSECA: si riferisce al fatto che si attiva per azione di componenti che esistono nel sangue, nel plasma e che travasano dal sangue ai tessuti;

b) la via ESTRINSECA: questa dipende invece dal fatto che i tessuti, le cellule dei tessuti liberano dei fattori attivanti il sistema.

Abbiamo quindi la via intrinseca che parte dal fattore di Hageman attivato e la via estrinseca che dipende da attivatori che originano dai tessuti. Queste due vie usando sempre lo stesso sistema dell'attivazione a cascata in cui a monte si attiva un componente che acquisisce così attività enzimatica che va quindi ad attivare un componente a valle che rilascia a sua volta un fattore di degradazione che andrà ad attivare per taglio proteolitico un componente a valle e così via.

Ad un certo punto le due vie convergono, precisamente a livello del fattore VII. (dalla registrazione pare che abbia aggiunto ancora qualcosa ma risulta incomprensibile, ndr)

Nel caso della via intrinseca si parla genericamente di rilascio del fattore tissutale (TF); ci sono fattori tissutali specifici e generici ma comunque capaci di attivare il sistema.

Nella reazione infiammatoria ci sono molte condizioni responsabili dell’attivazione del sistema coagulativo sia secondo la via estrinseca sia secondo la via intrinseca:
- danno ai tessuti: quando si ha danno ai tessuti si possono avere diverse conseguenze come acidificazione per esposizione cariche negative come glicani (non sono sicura al cento per cento, ndr), liberazione di enzimi che per esempio hanno attività proteasica, esposizione in superficie di cariche negative. Tutte queste condizioni attivano il fattore di Hageman.

- Fenomeni emorragici, dopo i quali scatta immediatamente il fenomeno della coagulazione e si ha prima la formazione del tappo piastrinico e successivamente del tappo fibrinico.
- Aggregazione delle piastrine: queste quando si aggregano si attivano e rilasciano fattori che innescano formazione del coagulo a cui seguirà poi l’ attivazione della plasmina e del sistema delle chinine.
- Attivazione di altri sistemi polimolecolari solubili i quali direttamente o con meccanismo feedback vanno anch'essi ad attivare il fattore di Hageman.
- Presenza di endotossine o proteasi batteriche che possono attaccare questi sistemi e attivarli.
- Citochine che inducono modificazioni come il TNF o l’IL-1 che sono citochine proinfiammatorie che inducono modificazioni degli endoteli in senso protrombotico, per esempio c'è una attivazione dell'espressione del fattore tissutale. (aggiunge poi ancora qualcosa ma risulta incomprensibile, ndr).

Di tutte queste condizioni il meccanismo più importante, o meglio quello che più fa comodo nell'ottica dei sistemi polimolecolari solubili, è l'attivazione del fattore di Hageman.

(Si noti che come per il sistema della coagulazione anche per il sistema della chinine, come visto ieri, si possono distunguere due vie di attivazione, una intrinseca e una estrinseca; l' attivazione intrinseca per l'azione di fattori presenti nel sangue, ovvero quando si attiva il fattore di Hageman che va ad attivare la precallicreina che diventa callicreina si attivano le chinine e quella estrinseca, nella quale abbiamo proteasi liberate dalle cellule, dai leucociti, dai batteri che vanno a attaccare le chinine o meglio si comportano come chininogenasi che attivano chininogeni in chinine. D'altronde si ripete come il sistema della chinine e il sistema della coagulazione diano strettamente collegati).

Per quanto riguarda il sistema della coagulazione lo scopo finale è quello di determinare l'attivazione della trombina la quale acquisisce attività enzimatica quando viene attivato il suo precursore, la protrombina.

(commentando uno schema) La trombina (lui ha detto protrombina a questo punto ma io dalle slides avevo copiato trombina, ndr) attacca il fibrinogeno (una delle proteine del sangue a più elevata concentrazione) lo degrada attivandolo a fibrina e favorisce la formazione della rete di fibrina; si noti come lo scopo ultimo di tutte le vie rappresentate sulla diapositiva sia l' attivazione della trombina, la formazione della trombino attiva che poi (ripete precisando alcune cose, ndr) in presenza di calcio degrada, taglia il fibrinogeno; si forma quindi la rete di fibrina che poi forma questo tappo, il coagulo;

Come conseguenza dell'azione della trombina a livello del fibrinogeno si ha a liberazione di alcuni componenti del fibrinogeno che sono prodotti di degradazione e che hanno una attività biologica che può essere più o meno importante. A noi interessano e sono quelli che rappresentano i mediatori proinfiammatori: fibrinopeptide a e fibrinopentide b (che, ripetendo, originano per azione della trombina sul fibrinogeno).

(commenta uno schema): si rappresenta qui il collegamento che ci può essere tra il sistema della coagulazione e l'attivazione del complemento. Quando si attiva la cascata della coagulazione alcuni prodotti enzimatici possono andare ad attivare componenti del complemento: agiscono su C3 e su C5 determinando la formazione di C3a e C5a che hanno poi azione biologica.

Quando si attiva la coagulazione immediatamente scatta anche il sistema della plasmina (lo descrive nel dettaglio più avanti, ndr): cioè un sistema di controllo negativo perché la formazione del coagulo è un processo continuo che poi deve terminare e questo succede quando si attiva plasmina. La plasmina è un enzima che deriva dal plasminogeno che degrada fibrina (il coagulo si scioglie!). I due sistemi sono contemporanei e si ha quindi che il coagulo si forma e si scioglie, si forma e si scioglie e così via. Quindi il sistema della plasmina fa si che la plasmina vada a sciogliere il coagulo, attaccando la fibrina.

(Commenta figura): (dice che la figura in questione non è molto chiara e a suo avviso il tipo che l'ha fatta non ha capito nulla) il fibrinogeno che viene attaccato dalla trombina liberando così i fibrinopeptidi (attraverso degradazione delle estremità) e formando infine la rete di fibrina.

Successivamente per attacco della fibrina per azione della plasmina si generano ulteriori prodotti di degradazione, quali il frammento e e altri (sono scritti sulle slides, ndr).
Questi fibrinopeptidi, generati dalla trombina e dalla plasmina, vengono liberati e hanno attività proinfiammatoria:

- favoriscono la migrazione e l'aumento dell'adesione del leucocita che migra;
- stimolano la produzione di altri mediatori proinfiammatori, per esempio dai macrofagi (una serie di citochine proinfiammatorie e altri mediatori che vedremo).
- altri (immagino siano segnati sulle slides, lui non ne ha elencati altri, ndr)

Si comincia ora a sapere esattamente su quali recettori vanno ad agire ma non scendiamo così nel dettaglio; basti sapere qual è il loro fine ultimo e cioè quello di favore la flogosi.

L'attivazione della coagulazione porta quindi a flogosi; favorisce fenomeni flogistici perché origina una serie di mediatori sia attraverso il fattore di Hageman e l'attivazione dei sistemi polimolecolari solubili (coagulazione, chinine e anche complemento o direttamente o attraverso il sistema della plasmina o delle chinine), sia attraverso la trombina: enzima molto potente che attracca il fibrinogeno ma poi è in grado di riconoscere e attaccare altri recettori.
La trombina può cioè funzionare a sua volta da mediatore proinfiammatorio:
- attiva la plasmina;
- favorisce l'aggregazione piastrinica: questo è un altro fenomeno importante perché quando le piastrine si aggregano si attivano e cominciano a degranulare cioè a rilasciare per esocitosi una serie di composti contenuti all' interno di granuli (si parla di degranulazione o esocitosi); si tratta di composti come le prostaglandine.

Quindi alla fine, per attivazione della coagulazione, abbiamo un' ulteriore produzione di mediatori finali quali:
- derivati dal sistema del complemento;
- chinine;
- derivati dell'acido arachidonico;

- fibrinopeptidi liberati per azione della plasmina;
- istamina (perché questi mediatori vanno a agire anche sui mastociti);
- serotonina;
- fattori lisosomiali.

Inibitori della coagulazione

Sono rappresentati da inibitori di proteasi, quali:
- C1 inhibitor;
- antitrombina;
- ï • ¡2 macroglobina;
- ï • ¡1 antiplasmina;
- ï • ¡2 antitripsina.

Queste proteine sono prodotte dal fegato in grande quantità ma anche dagli stessi leucociti,dalle cellule dei tessuti ecc.

Ancora una volta questi mediatori possono agire inibendo enzimi attivati durante le varie cascate.

IL SISTEMA DELLA PLASMINA

Il suo ruolo è quello di determinare alla fine l'attivazione della plasmina; la plasmina è un enzima che viene attivato nel plasma e che ha azione proteolitica sulla fibrina ma anche su altri bersagli, altre proteine che possono essere riconosciute.

Il sistema della plasmina è composto da diversi fattori(i fattori sono due da quanto segue, ndr): il plasminogeno e un suo attivatore.
Il plasminogeno è il precursore inattivo della plasmina ed è anch'esso prodotto dal fegato e viene attivato in plasmina per azione di un attivatore del plasminogeno che normalmente è allo stato inattivo e si chiama proattivatore del plasminogeno.

(Commenta immagine): il plasminogeno è qui rappresentato da un animale (lui ha detto che il plasminogeno è la forbice ma dalla figura è evidente il contrario, ndr) e l'attivatore da una forbice- il plasminogeno inattivo è qui rappresentato da un animale con la museruola che viene attivato dal taglio della museruola da parte della forbice (che rappresenta l'attivatore, ndr) e può quindi cominciare a "mangiare" ovvero comincia a degradare la fibrina.

Attivazione del sistema della plasmina

Si hanno diversi fattori attivanti il sistema:
- la coagulazione (tramite il fattore di Hageman)
- la trombina, che favorisce la formazione della fibrina e contemporaneamente attiva la plasmina;
- enzimi proteolitici tissutali;
- enzimi batterici.

Anche qui possiamo identificare un sistema (via, ndr) intrinseco e un sistema estrinseco:
a) sistema intrinseco: è di origine plasmatica cioè i suoi componenti sono presenti nel plasma;
b)sistema intrinseco: in cui i componenti derivano dai tessuti e ce ne possono essere tanti.

Alla fine questi sistemi convergono nell'indurre l'attivazione dell'attivatore del plasminogeno che poi attacca plasminogeno e si forma plasmina.

(Commenta schema): si ha l'attivatore del plasminogeno inattivo; poi arrivano una serie di enzimi (per esempio l'elastasi - rilasciata da molte cellule e presente anche nei granuli dei neutrofili- callicreina, tripsina g -altro enzima dei granuli neutrofili- la stessa trombina e la stessa plasmina) che agiscono sull'attivatore inattivo rendendolo attivo e si forma così la plasmina. Poi questa può andare a attivare il complemento attaccando C5, C3 e atri fattori. (nb: legge una slide che non ho per verificare!ndr).

Azione biologica della plasmina

E' un enzima e può agire su vari bersagli;

- Cruciale per quanto riguarda l'attivazione del sistema è la fibrina formata attraverso l'attivazione del sistema della coagulazione (ho riportato quello che lui ha detto; immagino voglia dire che l'azione principale della plasmina è esplicata sulla fibrina in modo da sciogliere il coagulo); a partire da essa si formano peptidi di degradazione, di escissione, i quali possono avere azione proinfiammatoria: chemiotassi, (qui dice qualcosa di incomprensibile dalla registrazione e anche a lezione non avevo colto; potrebbe essere qualcosa del tipo "modulazione dei vasi"), vasodilatazione,attivazione del (incomprensibile).

- attiva quindi il complemento sulla via del C1 o agendo direttamente su alcuni componenti quali il C3 o il C5 dando C3a e C5a con la conseguente azione biologica (detta azione da anafilotossine del C3a e del C5a).

-La plasmina può attivare anche il fattore di Hageman e quindi la coagulazione e poi indirettamente il sistema delle chinine con conseguente produzione di dolore, vasodilatazione e regolazione (non sono sicura, registrazione poco chiara, ndr) dei vasi e attivazione dei leucociti e dei fibroblasti.(Cose viste anche nella lezione precedente. NDR).

La plasmina così come la trombina può andare a stimolare direttamente le cellule ma è chiaro che in generale le proteasi possono andare ad attaccare la membrana cellulare delle varie cellule bersaglio e stimolarne, o perché ci sono dei recettori o perché degradano dei componenti della membrana i quali sono magari responsabili del mantenimento della cellula in uno stato inattivo e quando queste strutture sono degradate si ha una modificazione conformazione e magari la trasduzione di un segnale attivatorio intracellulare alla cellula (praticamente viene a mancare quello inibitorio? Ndr).

In ogni caso, si hanno tutta una serie di azioni che possono essere indotte dalla plasmina per una azione sua diretta sulla cellula quali:
- migrazione dei leucociti;
- induzione della produzione di citochine;
- attivazione delle piastrine;
- proliferazione delle cellule muscolari lisce e degli epatociti;
- polarizzazione Th1 mediata dalle cellule dendritiche.

(Commenta una tabella): sono riportati diversi tipi di cellule che possono essere attivate dalla plasmina e l'effetto che questa ha sulle varie colture cellulari; sono spesso situazioni di tipo proinfiammatorio. In alcuni casi conosciamo anche i recettori coinvolti.

Inibitori della plasmina

- C1 inhibitor ;
- altri (ha nominato solo il C1 inhibitor, gli altri sono elencati sulle diapositive, ndr).

(Commenta uno schema) Si noti la parte nel riquadro: illustra la via di attivazione del sistema della plasmina con effetti biologici; all'interno di un altro riquadro, box, è indicato il livello di inibizione di alcuni inibitori di proteasi (C1 inhibitor, un farmaco usato in terapia e altri). (legge slide in modo incompresibile ndr).

(Commenta una tabella): si tratta di una tabella abbastanza riassuntiva che riporta quelli che sono gli inibitori di proteasi presenti nel plasma, la loro concentrazione (alcune sono altissime! Fa alcuni esempi, vedi tabella ndr) (si focalizza quindi sull'unità di misura dei vari valori riportati. Attenzione alla concentrazione delle proteine nel sangue espressa in mg o g/dl! Invece la concentrazione delle cellule nel sangue si esprime in numero su ï • l. C'è una bella differenza tra ï • l e dl!). E' poi riportato l'enzima inibito e quelle che eventualmente possono essere le conseguenze da un punto di vista clinico.

Interazioni tra i sistemi polimolecolari solubili

- Fattore di Hageman (quello cruciale perché attiva coagulazione, chinina, plasmina e complemento);
- Plamina (scinde fibrina in fibrinogeno e poi indirettamente attiva anche gli altri tre);
- Chinine (l'enzima chiave è la callicreina che scinde il fattore VII, attiva complemento e il fattore di Hageman);

- Attivazione contemporanea della coagulazione e del complemento da endotossine e immunocomplessi; (questo è un esempio) parte dello shock endotossico (infiammazione sistemica acuta gravissima) è legata in parte anche alla produzione massiva di mediatori proinfiammatori e dall'altra parte da endotossine che attivano coagulazione;

- Poi abbiamo la trombina che attiva le cellule dell'infiammazione.

(Commenta uno schema): si tratta di un altro schema forse da mettere all'inizio.
Nota: PAR = protease activator receptors : la trombina attacca le cellule attraverso questi recettori.

PRINCIPALI MEDIATORI DI ORIGINE CELLULARE

a) Mediatori secreti rapidissimamente perché preformati e immagazzinati all'interno della cellula all'interno di granuli; questi sono:
- istamina;
- serotonina;
- enzimi.

ISTAMINA

È un’amina vasoattiva che deriva dall’istidina ed è prodotta principalmente dai mastociti per azione della istidina decarbossilasi. Può anche essere rapidamente degradata da enzimi di degradazione come la monoaminoossidasi e diaminoossidasi: sono formati e devono funzionare esattamente per quello per cui servono e dove servono; si hanno conseguenze gravi se funzionano oltre il lecito e quindi ci sono sistemi di controllo a vari livelli e sistemi di controllo multipli per degradarli o per bloccarne la funzione in vari modi (a livello del recettore, a livello del segnale ecc ecc).

L’istamina è un mediatore molto importante prodotto dai mastociti ed è sempre associata, ed è giusto, alle reazione allergiche (quindi alle reazione di ipersensibilità di tipo I); in queste reazioni si ha una liberazione acuta di istamina da parte di mastociti in quanto questi, nei soggetti allergici (e quindi con i mastociti sensibilizzati all'allergene in questione), hanno già sulla membrana le IgE prodotte durante il primo incontro con l'antigene e queste sono già legate al loro specifico recettore e quindi già pronte a reagire. Quando vengono in contatto con l'allergene si ha che le IgE lo riconoscono, avviene un cross linking mediato (stimolazione multipla) che attiva un segnale di trasduzione e determina immediatamente la liberazione dei granuli da parte dei mastociti; in questi granuli sono contenuti molti mediatori tra cui istamina ad altissima concentrazione che viene liberata dando un effetto acuto. Gli effetti biologici che si hanno sono:
- contrattilità delle cellule muscolari lisce;
- aumento della permeabilità;
- …

Questi stessi segnali nel tempo inducono la trascrizione di altri mediatori, quali citochine, e sono responsabili delle cosiddette infiammazione allergiche (quelle che perdurano dopo che è avvenuta la degranulazione acuta).

Si noti che l’istamina non è legata esclusivamente a questa azione ma può anche essere rilasciata durante un’infiammazione acuta perché si formano una serie di mediatori proinfiammatori (elenco slides, ndr) in grado di stimolare subito i mastociti e indurre la liberazione di istamina.
I mastociti sono localizzati vicini ai piccoli vasi a livello del “polo +” in modo che liberando l'istamina modulino il tono vasale ecc ecc.

Fattori che inducono la liberazione di istamina

I fattori che inducono la liberazione di istamina sono quindi, per esempio:
- peptidi: C3a, C5a, chinine; questi determinano un aumento della permeabilità e della regolazione del tono vascolare perché fanno rilasciare l'istamina da parte dei mastociti;
- enzimi: proteasi, fosfolipasi;
- tossine batteriche;
- idroperossidi (mediatori liberati dalla cascata dell'acido arachidonico) e leucotrieni B4 (altro derivato dall'acido arachidonico);
- il PAF, un altro mediatore lipidico liberato dal metabolismo dei fosfolipidi;
- la sostanza p, liberata per esempio dalle terminazioni nervose;
- le lectine (usate in laboratorio);
- IL-5;
- H2O2, ionofori del calcio (sostanza usata in laboratorio per stimolare la degranulazione; questo perché l'esocitosi avviene secondo meccanismi per cui è cruciale l'aumento del calcio intracellulare e quindi tutto ciò che lo fa aumentare può favorire l' esocitosi);
- il calore, la variazione di temperatura;
- l’ATP;
- … la lista potrebbe essere più lunga.

Effetti proangioflogistici (locali) dell’istamina

Gli effetti proangioflogistici dell'istamina sono:
- iperemia (aumento del flusso sanguigno a livello locale);
- aumento di permeabilità con un’azione diretta e una indiretta; con l’azione diretta agisce direttamente sulle cellule endoteliali mentre con quella indiretta induce la produzione di altri mediatori che favoriscono l'aumento della permeabilità come gli eicosanoidi e l’ossido nitrico;
- rolling e adesione per aumento dell’espressione delle selectine p sull'endotelio;
- chemiotassi per gli eosinofili;
- attivazione della secrezione di muco;
- prurito;
- stimolazione della produzione di eicosanoidi con effetti vasodilatatori;
- attivazione della contrazione della muscolatura liscia dell'intestino e dei bronchi;
- stimolazione della produzione di ossido nitrico da parte degli endoteliociti;
- stimolazione della secrezione di acido cloridrico da parte della mucosa gastrica.

Questo elenco si riferisce agli effetti locali con istamina a bassi livelli.

Effetti generali dell’istamina

Passiamo ora agli effetti generali dell'istamina, quelli dello shock anafilattico, delle reazione allergiche acute di tipo primo. Sono più o meno gli stessi di quelli locali ma amplificati. Questi sono:
- vasodilatazione;
- caduta della pressione;
- emoconcentrazione;
- leucopenia (il prof dice qui di non sapere perchè);
- abbassamento della temperatura corporea;
(Si hanno quindi una serie di fenomeni legati alla caduta della pressione e quindi anche all’aumento della vasodilatazione).
- stenosi delle vie aeree, restringimento vie aeree e quindi contrazione che porta a dispnea(difficoltà nell'atto respiratori), vomito, diarrea, salivazione.

Gli effetti dell’istamina sono molteplici: a livello della risposta infiammatoria, a livello delle cellule dello stomaco (perchè aumenta la secrezione di HCl) e anche a livello del SNC (dove può funzionare come neurotrasmettitore); le sue azioni si esplicano mediante dei recettori e quindi i diversi fenomeni biologici legati ad essa sono spiegati dall’esistenza di più recettori (H1R, H2R, H4R…).
Questi recettori hanno un'espressione differenziale cellula specifica. Sono molto studiati dal punto di vista del signaling per imparare a conoscerlo in modo da identificare cosa sia di specifico che porta a quella determinata risposta e non a un'altra. Conoscendo questa si potrebbe inibire l'effetto specifico e non l'altro perché si potrebbero altrimenti avere degli effetti collaterali. Si conoscono abbastanza bene questi signaling, la loro funzione fisiologica generale, la rilevanza patologica, per esempio:
- H1R per fenomeni di ipersensibilità mediata (reazioni allergiche);
- H2R responsabili del rilascio di Hcl che se incontrollato può portare a gastriti, infiammazioni dello stomaco fino ad ulcere;
- H4R per infiammazione e prurito.

Esistono ora dei farmaci specifici per questi recettori. (NB: errore nella tabella- ultima riga è selectin anatagonist).

Vi sono anche una serie di azioni importanti nell'ambito della risposta immunitaria su cui non si sofferma; comunque gli effetti da parte dell'istamina a livello delle cellule del sistema immunitario dipendono dall'espressione di vari recettori che possono essere espressi in maniera differenziale o addirittura possono essere modulati dalla stessa cellula a seconda del loro stato di maturazione o attivazione.
Per esempio: l’istamina attraverso la stimolazione delle cellule dendritiche, a seconda del tipo di recettore (H1R, H4R ecc) e a seconda del contesto in cui lavorano possono favorire la modulazione della polarizzazione della risposta verso Th1 rispetto a Th2 e viceversa. Possono quindi condizionare la polarizzazione dei linfociti. (Chiaramente non da sola ma in concerto con altre sostanze). Questi recettori sono espressi differenzialmente sui linfociti Th1 e Th2 e possono essere usati insieme ad altre molecole come marcatori per questi linfociti polarizzati.

SEROTONINA

La serotonina è un’amina detta anche 5-idrossi-triptamina che deriva dal metabolismo del triptofano per opera di vari enzimi. E’ prodotta principalmente dalle piastrine e ha come effetti:
- aumento della permeabilità;
- funzione vasoattiva;
- attivazione della produzione di ossido nitrico che favorisce l’aumento della permeabilità e stimola anche i fibroblasti.

Nel topo anche i mastociti possono produrre serotonina, nell'uomo no.

ENZIMI

Di questi altri mediatori ne parleremo in dettaglio mano a mano che parleremo dei vari tipi cellulari; si tratta di enzimi preformati che hanno azione proflogistica. Vengono rilasciati dale cellule del tessuto danneggiato oppure dai leucociti attivati che infiltrano i tessuti; sono tantissimi.

Una categoria con una potente azione proinfiammatoria sono gli enzimi lisosomali che sono rilasciati dai lisosomi; importanti in modo particolare per la reazione infiammatoria acuta sono gli enzimi lisosomiali rilasciati dai lisosomi dei neutrofili. I neutrofili sono cellule considerate come borse che all'interno hanno sacchettini di granuli. Ne hanno tantissimi, di diversa natura e diverso tipo. Questi granuli si vanno a localizzare in compartimenti relativamente specifici e con un contenuto abbastanza specifico. Si individuano:
- granuli azurofili o primari che corrispondono ai lisosomi;
- granuli secondari o specifici;
- granuli terziari;
- vescicole secretorie.

Questi enzimi possono amplificare la risposta infiammatoria perché per esempio vanno ad attivare il complemento, vanno a degradare componenti del sistema del complemento e possono favorire il rilascio di amine vasoattive; si intende C5a e C3a (polipeptidi) che andranno ad attivare il rilascio di amine vasoattive (istamina). In generale questi enzimi amplificano la risposta infiammatoria con diversi metodi, quali:
- tramite il sistema del complemento (vedi sopra, ndr);
- aggregazione piastrinica (e quindi favorisce la coagulazione);
- plasmina;
- chinina;
- degradazione del collagene e di altri componenti della matrice extracellulare; agendo a questi livelli possono a loro volta generare frammenti proteolitici che possono avere attività biologica;
- chemotassi.

Esempio: le principali caratteristiche (di una classe sola) delle proteasi neutre quali l'attivatore del plasminogeno, la pepsina g, elastasi, (cheratinasi?); questi enzimi a loro volta possono essere raggruppati in famiglie sulla base delle attività. Queste (riferendosi alla slide) in particolare sono serpine perché attaccano la serina del loro bersaglio. I substrati sono plasminogeno, collagene, proteoglicani , elastina ecc.
Gli inibitori sono i serpin inhibiors.
Alcuni già visti e atri come TIMP (tissue inhibitor of metallo protease).

Per quanto riguarda l'inibizione vale il solito concetto: esistono inibitori che controllano l' attività enzimatica di questi componenti.

b) Mediatori di origine cellulare, neoformati, che poi vengono rilasciati. Sono:
- radicali liberi dell'ossigeno;
- radicali liberi dell'azoto come per esempio l'ossido nitrico;
- derivati dell'acido arachidonico o più in generale mediatori di origine lipidica;
- PAF (fattore attivante le piastrine).

RADICALI LIBERI DELL'OSSIGENO

I radicali libero dell'ossigeno sono prodotti da varie fonti; possono essere liberati da diverse fonti, vari sistemi enzimatici. A noi interessano, nell'ambito della risposta infiammatoria, quelli prodotti dalla NADPH OSSIDASI. Questo è un enzima che tempo fa si pensava fosse specifico dei fagociti mentre oggi si sa che è presente in diversi tipi di cellule. Quella dei fagociti però è molto peculiare. Comunque in generale sono espresse da tantissime cellule. A noi interessa questa dei fagociti perché a differenza delle altre nadph ossidasi è in grado di produrre quantità industriali di radicali liberi dell'ossigeno. Questo enzima media il respiratory burst, l'esplosione respiratoria; cioè si riferisce al fatto che queste cellule, quando sono attivate o meglio quando si attiva la nadph ossidasi, hanno un consumo enorme dell'ossigeno dall'ambiente, è un fenomeno acuto. Si ha uno stimolo e nel giro di pochi secondi si attiva la nadph ossidasi e scarica questi radicali liberi dell'ossigeno che a loro volta hanno un'emivita brevissima, come si vedrà più avanti, e che sono dei mediatori fondamentali, cruciali per la distruzione, eliminazione degli agenti patogeni che sono fagocitati per esempio da parte del neutrofilo.

(Commenta uno schema): è rappresentato un neutrofilo che dopo aver fagocitato attiva la nadph ossidasi per produrre l'anione superossido (consuma l'ossigeno e lo riduce ad anione superossido); questo a sua volta può poi essere metabolizzato per produrre tutta una serie di radicali liberi dell'ossigeno che sono estremamente tossici per i batteri fagocitati.

Questi radicali liberi possono anche essere rilasciati all'esterno e possono quindi causare dei danni ai tessuti e alle cellule: si parla di bystander damage cioè si ha che cellule "innocenti" vengono colpite da questi radicali che possono avere quindi azione tossica (non solo sugli agenti patogeni ma anche su cellule e tessuti non colpiti, ndr). Quindi la produzione di radicali libero dell'ossigeno è, da una parte, un meccanismo fondamentale per l'eliminazione di agenti patogeni ma, dall'altra, quando si verificano per esempio fenomeni di "leaking" o quando l'attivazione e il rilascio non è ben controllata, possono esercitare un'azione tossica amplificando la risposta immunitaria e provocando danno.

La NADPH OSSIDASI

Questo enzima in realtà consiste in una catena enzimatica composta da diverse subunità che sono illustrate nella figura e sono: gp91, p22, p67, p47, p40; (sulla diapositiva c'è scritto "phox" a fianco al nome della subunità che sta per "phacocyte oxidase").
Questa catena enzimatica, in una cellula non stimolata e cioè che non ha fagocitato o comunque non ha ricevuto altri stimoli in grado di attivare la nadph ossidasi, è disassemblata e l'enzima non funziona (sarebbe un problema se funzionasse perché significherebbe avere una produzione basale di radicali liberi che risulterebbe tossica). Quando si trova in questo stato inattivo è composta da gp91 e p22, che formando il citocromo b, localizzato sulla membrana; hanno un bassissimo potenziale di ossidoriduzione che favorisce la riduzione dell'ossigeno. Si ha quindi un citocromo composto da queste due proteine a livello della membrana (nei neutrofili si localizza anche a livello dei granuli) e tre componenti che invece si trovano nel citoplasma, non assemblati, dispersi, ma ovviamente collegati al citoscheletro.
Quando la cellula riceve il segnale di attivazione, per esempio quando ha fagocitato, allora il sistema si deve attivare e si ha quindi

una traslocazione dei componenti citosolici a livello della membrana, vedremo più avanti da cosa è mediata ma già dall'immagine si vede come sia mediata da fenomeni di fosforilazione di questi componenti; quindi l'enzima si assembla e si attiva e riduce l'ossigeno a formare l'anione superossido.

(Commenta schema): ci sono anche delle g protein sia sulla membrana sia nel citosol che favoriscono questo processo di assemblamento.

(Commenta schema): il substrato di questo enzima è la NADPH che dona quindi elettroni all'enzima che passano poi all'ossigeno, riducendolo.

I componenti dell'enzima sono quindi:
- il citocromo b 558 (aggiunge qualcosa di incomprensibile, ndr) formato da due catene, tra l'altro codificate da geni localizzati su cromosomi diversi e che sono fondamentali per l'assemblamento;
- componenti citoplasmatici;
- alcune proteine della famiglia delle g protein che favoriscono l'assemblamento;
- delle protein chinasi, quindi enzimi con capacità di fosforilare proteine bersaglio e cofattori (sule slides c'è una tabella che riporta quanto detto e che dobbiamo guardarci bene)

Tutti questi sono stati abbondantemente studiati e si conoscono perfettamente i vari domini, quali sono le regioni che svolgono varie attività enzimatiche ecc.

L'assemblaggio del sistema dipende soprattutto dalla fosforilazione da parte di chinasi. Quindi, quando la cellula si attiva (abbiamo visto che ci sono una serie di condizioni che favoriscono la stimolazione di questo sistema, non solo la fagocitosi ma tanti agonisti che riconoscono recettori sulla superficie dei neutrofili e possono attivare la nadph ossidasi) queste chinasi vanno a fosforilare i vari componenti e a attivare l'enzima. (quest'ultima frase l'ho completata io, ndr).
Per esempio: le chemochine come C5a e C3a possono attivare i neutrofili e tanti altri.

Questi agonisti funzionano attraverso segnali di trasduzione che portano all'attivazione di varie protein chinasi che vanno a fosforilare i diversi componenti citosolici ma anche i componenti sulla membrana, e determinano infine la traslocazione dei componenti citoplasmatici sulla membrana. Ci sono tante chinasi e conosciamo gli enzimi, è un argomento molto studiato.

Questo enzima viene attivato quando il neutrofilo, per esempio, fagocita particelle estranee e forma vacuoli chiamati fagosomi; quando questo di forma in quel determinato punto va a localizzarsi e attivarsi la nadph ossidasi, in modo da scaricare all'interno del fagosoma i prodotti che derivano dall'attivazione dell'enzima, cioè l'anione supersossido;

La nadph ossidasi è fondamentale perchè rappresenta uno dei meccanismi x la degradazione e uccisione dei microbi fagocitati; questo enzima lavora anche in concerto con altri mediatori tossici che sono scaricati all'interno del vacuolo fagocitario; quando avviene la fagocitosi (che avviene anch'essa come conseguenza di una serie di tappe quali riconoscimento, avvolgimento ecc.), si forma questo vacuolo e i granuli contenuti nel citoplasma dei neutrofili a un certo punto si fondono col vacuolo e scaricano all'interno del fagosoma il contenuto dei granuli; x esempio anche la mieloperossidasi (MPO) che è uno degli enzimi specifici dei granulociti neutrofili. Quindi all'interno del vacuolo fagocitario, che deriva dalla fusione di questo vacuolo con i granuli dei neutrofili, da una parte si attiva la nadph ossidasi e dall'altra vi vengono scaricati enzimi litici contenuti nei granuli. Questa serie di altri fattori hanno un loro ruolo specifico ma agiscono anche in concerto con la nadph ossidasi generando una serie di metaboliti dell'ossigeno sempre più tossici: quindi non solo anione superossido ma anche acqua ossigenata, ipoclorito, radicale idrossile.

Come accennato prima, questa nadph ossidasi ha questo nome perchè il substrato è la NADPH e questo cede gli elettroni all'ossigeno.
Questa si genera dal metabolismo del glucosio 6 fosfato e quindi il rifornimento deriva dal ciclo dei pentosi fosfati attraverso una serie di tappe metaboliche che avvengono lungo questo ciclo in modo particolare per azione di due enzimi.

Fattori attivanti l'esplosione respiratoria

I più comuni fattori attivanti il burst respiratorio sono:

- la fagocitosi;
- superfici ricoperte da immunocomplessi e quindi attraverso gli Fc R si può attivare l'enzima;
- anticorpi anti leucociti; (si sono descritte alcune malattie autommuni in cui si formano anticorpi contro il self che determinano l'attivazione della nadph ossidasi determinando il rilascio di radicali liberi dell'ossigeno che hanno azione tossica e contribuiscono alla patogenesi della malattia in questione);
- lectine, che sono sostanze vegetali ricche di glucidi che possono essere riconosciute e quindi stimolare i neutrofili;
- gli acidi grassi, per es lo stesso acido arachidonico è uno stimolo importante;
- immunocomplessi solubili;
- fattori del sistema del complemento, quali C3a e C5a;
- PAF;

- leucotrieni;
- peptidi chemiotattici (ricorda MFLP, peptide chemotattico di origine batterica);
- detergenti;
- sodio fluoruro;
- esteri del forbolo (una sostanza tossica usata in laboratorio);
- diacilglicerolo (DAG).

(Commenta dei grafici): è illustrato in cosa consiste l'intensità e la rapidità del fenomeno; questa figura mostra un esperimento in vitro in cui si pone una sospensione di neutrofili isolati dal sangue in una vaschetta (20 milioni di neutrofili) sospesi in presenza di un numero equivalente di batteri; si ha che nel giro di un minuto ma spesso anche meno, se si misura il consumo di ossigeno, tutto l'ossigeno contenuto nella vaschetta finisce. A questo consumo corrisponde un'attivazione del metabolismo del glucosio per produrre nadph. Se si misura la produzione di anione superossido o di H2O2 che deriva dall'anione superossido si nota che sono prodotte in maniera massiva subito dopo l'aggiunta del batterio. Poi a seconda del tipo di stimolo (ce ne sono alcuni potentissimi che nel giro di pochi secondi provocano un'attivazione notevole che continua nel tempo, altri sono molto più lenti) si avrà una diversa attivazione.

Questa produzione di radicali liberi dell'ossigeno è un fenomeno importantissimo in quanto rappresenta uno dei meccanismi usati dai fagociti per uccidere i batteri e rientra in quelli che sono definiti meccanismi OSSIGENO DIPENDENTI (appartenenti ai meccanismi battericidi) e produce direttamente anione superossido e, come conseguenza, un'altra serie di metaboliti tossici derivati dall'ossigeno come H2O2 e radicali idrossile. Nell'ambito dei meccanismi ossigeno dipendenti si includono anche dei meccanismi mediati dalla MPO (aminoperossidasi): un enzima contenuto nei granuli dei neutrofili che, come si vedrà, collabora con la nadph ossidasi e aiuta a metabolizzare alcuni derivati dell'ossigeno per produrne altri.
Sempre appartenenti ai meccanismi battericidi si descrivono poi meccanismi OSSIGENO INDIPENDENTI.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 3/12/2012

Sbobinatore: Elisa Schiavone

Revisore: Alessandro Depaoli

Patologia, prof. Berton

03/12/12

[*Rassegna su e-learning, sull'ipertrofia cardiaca; il professore inoltre segnala la lezione "Aterosclerosi" caricata sul sito, sulla quale molto probabilmente non riuscirà a fare lezione. Le immagini della stessa sono tratte da un'ulteriore rassegna caricata]*

TIROSIN CHINASI PLASMATICHE

Partiamo ora dal capostipite delle tirosin-chinasi citoplasmatiche: **Src**, che può essere attivato da molteplici vie di trasduzione del segnale, e alcune sono indicate in questa slide (slide 7). Può legarsi ai **recettori dei fattori di crescita**, ai **G-protein-coupled receptors** e infine può essere implicato nella trasduzione del segnale a opera di **integrine**, sulla quale ora ci soffermiamo.

In questo contesto, vi sono due possibili meccanismi di attivazione di Src, e uno dei due è un meccanismo diretto: si può legare attraverso i domini SH3 alla catena b delle integrine, oppure si può legare ad un'altra tirosin-chinasi citoplasmatica, la Focal Adhesion Kinase (FAK), mediante un'interazione mediata dall'SH2 di Src che si lega alla fosfotirosina di FAK. Queste due chinasi cooperano e agiscono in questo contesto come un'unità di trasduzione del segnale da parte delle integrine.

Un aspetto centrale della regolazione della funzione delle integrine è rappresentato dal cosiddetto "inside-out signalling", nel quale un agonista, che è riconosciuto da un recettore sulla superficie della cellula, induce la modifica della coda citoplasmatica delle integrine determinando un aumento di affinità. Per analogia il fenomeno che stiamo analizzando viene chiamato **"outside-in signalling"**: in questo caso l'interazione dell'integrina con uno specifico ligando extracellulare *(outside)* si ripercuote in un fenomeno all'interno della cellula *(in)*. Questa terminologia consente di definire la funzione delle integrine non soltanto come recettori di adesione, implicati nell'arresto e nell'interazione tra cellule e proteine della matrice cellulare, ma anche come veri e propri recettori che trasducono il segnale.

In questa figura (slide 8) si vedono alcuni dettagli: Src si lega alla tyr397 di FAK, fosforila FAK attivandone l'attività chinasica (c'è un loop di attivazione reciproca tra queste due chinasi).

Questo (slide 9) è un riassunto del concetto di outside-in signalling, cioè proteine "crosslinkate" che interagiscono con i loro ligandi generano segnali che modificano l'interno della cellula.

Come viene regolata FAK?

La figura (slide 10) ci dice alcuni dettagli essenziali di FAK: ha l'N-terminale con un importante dominio **FERM**, diviso in sottodomini che mediano l'interazione di FAK con una serie di ligandi. Il dominio C-terminale è invece importante per l'interazione con una molecola, parte del citoscheletro, che è la **paxillina**. FAK si autofosforila in diversi residui, come nel 397, il quale media l'interazione con Src ma anche con le p85, subunità di PI3K attivate da segnali di fosforilazione in tirosina e anche la PLCγ. Al C-terminale c'è una tirosina fosforilasi che attiva la via **Ras**: Grab2, Sos, Ras. Questa chinasi è analoga ai recettori dei fattori di crescita, nel senso che attiva da una parte la via Ras, dall'altra la via che dipende dalle chinasi citoplasmatiche Src, PI3K e PLCγ (che non è una chinasi, ma una ! fosfolipasi fosfoinositide-specifica). In più FAK agisce come una **"docking protein"**, è in grado cioè di legare altre molecole, in particolare va sottolineata l'interazione con l'**oncogene Cas**, che non dipende dalla fosforilazione in tirosina di FAK, bensì dipende dal fatto che al C-terminale vi sia una sequenza ricca di **prolina** che permette il legame col dominio SH3 di Cas.

Questo schema (slide 11) sottolinea che anche questa chinasi è attivata spostando l'equilibrio tra interazioni intramolecolari in cui la chinasi è in uno stato chiuso, autoinibito, a interazionI che invece consentono l'apertura della molecola, soprattutto interazioni tra FAK e Src.

Questa figura (slide 12), apparentemente complessa, fa vedere che FAK, Src e le integrine organizzano un **complesso multimolecolare** che comprende una serie di proteine citoscheletriche, come paxillina, talina, vinculina e actinina, che partecipano alla formazione di siti in cui i filamenti di actina polimerizzata vengono organizzati. Una prima lettura della funzione di FAK fu quella che essa organizzasse questa struttura di actina polimerizzata; in realtà successivamente è stato enfatizzato come FAK, soprattutto in relazione con Src, sia importante nel favorire la dinamica e il riarrangiamento dell'actina polimerizzata e da questo punto di vista sia importante più che nell'adesione salda, nel turnover di queste adesioni salde nel movimento cellulare. Quindi, le mutazioni di FAK e Src vengono oggi viste nel contesto di una delle alterazioni delle cellule neoplastiche di tipo maligno che ha a che ! fare con il movimento, quindi mutazioni che causano gain of function possono favorire la motilità delle cellule, quindi l'invasività, e dunque la formazione delle metastasi.

Inoltre quest'unità di trasduzione del segnale regola un fenomeno che è stato chiamato **"anoikis"**, cioè una forma particolare di apoptosi che si esprime nel cosiddetto fenomeno della **crescita dipendente dall'ancoraggio**.

Piccola parentesi: è noto fin dagli anni '50 che la proliferazione di cellule non neoplastiche in coltura è dipendente dal fatto che queste cellule aderiscano a proteine della matrice extracellulare. Se non aderiscono, le cellule vanno incontro a un fenomeno che, diversi decenni dopo, venne interpretato come un fenomeno apoptotico.

Successivamente si comprese come l'anoikis sia un fenomeno inibito dall'outside-in signall integrinico: nel momento in cui le integrine mediano interazioni con proteine della matrice cellulare, organizzano questo signalling-complex che genera una serie di segnali che portano alla sopravvivenza. Abbiamo visto come FAK possa legare e attivare PI3K, la stessa cosa fa Src, c'è tutta la via Ras ecc. Quindi si è visto che una classica caratteristica delle cellule neoplastiche, soprattutto maligne, è la crescita indipendente dall'ancoraggio: anche se non aderiscono a proteine della matrice extracellulare le cellule neoplastiche sopravvivono e proliferano. Questo poi è stato visto nel contesto di vari fenomeni: alterazioni dell'interazione FAK-Src può generare segnali che favoriscono sopravvivenza e proliferazione indipendentemente dall'adesione integrinica, come invece succede fis! iologicamente.

Questa figura (slide 14) fa vedere alcuni possibili bersagli di questo complesso di trasduzione, dettagli che non chiedo. Questa via che comporta l'interazione Cas-FAK porta poi a effetto docking, legame di altre molecole, come Crak, e di un particolare GEF, che è il Dock180, che attiva ad esempio Rac, che sembra essere importante nel movimento cellulare.

FAK e Src sono due chinasi che sono anche state studiate nel fenomeno che collega la generazione dei radicali tossici dell'O_2 alla stimolazione di risposte nella cellula. I radicali non sono solo molecole tossiche implicate in difese biologiche e nel contesto di patologie infiammatorie e danno tissutale, ma è ormai emerso chiaramente il concetto che mediano una serie di risposte cellulari; infatti esistono diversi sistemi di generazione di radicali tossici dell'O_2 in diversi tipi di cellule. Uno dei meccanismi con cui i radicali agiscono è quello di regolare l'azione di fosfatasi, determinare cioè l'ossidazione di fosfatasi inattivandole. Nel contesto di un **equilibrio cellulare tra Tyr-phosphorilation e Tyr-dephosphorilation** questa inibizione di fosfatasi sposta l'equilibrio verso una maggior quantità di proteine fosforilate. Ci sono diverse protei! ne che possono essere attivate da eventi di fosforilazione come FAK e Src (anche se è la fosforilazione in Tyr416 che è attivante, non quella al C-terminale), recettori per fattori di crescita e varie MAPK che una volta fosforilate sono attive. Di conseguenza, i radicali spostano l'equilibrio verso l'attivazione di questi segnali.

Aggiungiamo un altro aspetto alla relazione tra trasduzione del segnale e movimento: esiste un fenomeno studiato nell'ultimo decennio, definito **"transizione epitelio-mesenchimale"**, che è una tipica modificazione dei tumori epiteliali metastatici. Nell'immagine (slide 16) si vedono: normali colture, che formano aggregati di cellule cuboidali, tipiche delle cellule epiteliali, e cellule epiteliali trasformate con fenotipo maligno, che assumono invece forma allungata e si distaccano le une dalle altre. Si parla in questo caso di transizione epitelio-mesenchimale, dove le cellule sembrano più simili a un fibroblasto, sono polarizzate, hanno un leading-front, che suggerisce che queste cellule siano dotate di una maggiore capacità di movimento. Questa transizione non è limitata soltanto al fenomeno neoplastico, anche se ivi è più marcata, ma avviene anche in situazion! i fisiologiche: si verifica durante lo sviluppo embrionale, nel quale si ha la formazione di organi e tessuti, e comporta la migrazione di cellule da una sede all'altra; avviene anche in tutti i processi di riparazione delle ferite e di rigenerazione tissutale. Questi fenomeni sono reversibili in tutti i casi (esiste anche la transizione mesenchimo-epiteliale: una volta colonizzato un altro distretto queste cellule -neoplastiche comprese!- riassumono le caratteristiche morfologiche più simili alle cellule epiteliali classiche). La transizione epitelio-mesenchimale è la tappa che si evidenzia nella conversione del carcinoma in situ in un vero carcinoma invasivo che attraverso i vasi raggiunge altri distretti. Un aspetto della transizione epitelio-mesenchimale riguarda una famiglia di molecole invasive costituita dalle **E-caderine**. Queste molecole mediano interazioni adesive di tipo **omotipico** (ossia tra cellule uguali): le ! E-caderine di una cellula mediano interazioni con le E-caderin! e espres se dalla cellula vicina. Queste strutture sono responsabili della formazione di giunzioni aderenti, meno salde delle tight junctions e con un carattere di maggiore reversibilità. Una caratteristica importante di queste E-caderine è inoltre che fungono nella coda citoplasmatica da sito di ancoraggio per molecole citoplasmatiche, le **catenine**, nella forma α e β. L'equilibrio tra forma legata all'E-caderina e forma libera della catenina regola diversi fenomeni. La **β-catenina** libera migra nel nucleo e diventa un fattore di trascrizione in grado di regolare geni implicati nella proliferazione cellulare. Esiste dunque un feedback positivo nel contesto della trasformazione neoplastica per queste alterazioni dell'interazione e, di conseguenza, dell'invasività della cellula neoplastica e della regolazione della proliferazione cellulare stessa. La **p120 catenina** è invec! e più direttamente implicata nella regolazione di fenomeni di movimento, in quanto nella forma libera attiva la GTPasi Rac, importante per il movimento, e inibisce l'attivazione della Rho, importante nella formazione delle stress fibers, siti di ancoraggio della cellula. La p120 catenina inoltre stabilizza l'E-caderina riducendo fenomeni di endocitosi e di degradazione. Le interazioni dell'E-caderina con β-catenina e p120catenina sono separate nel disegno, ma possono avvenire nella stessa coda citoplasmatica di una singola.

Esistono poi diverse situazioni dipendenti per esempio dalla "iper-attivazione" dei recettori dei fattori di crescita che possono portare a un disassemblaggio di queste interazioni e a risposte cellulari neoplastiche:

1. L'attivazione di **meccanismi trascrizionali** che fanno in modo che segnali derivanti da recettori per fattori di crescita inibiscano la trascrizione di E-caderine: meno queste sono espresse, meno strutturate sono le adherens junctions e al tempo stesso più libere nel citosol sono le catenine;
2. Un **effetto diretto** che porta alla fosforilazione e ubiquitinazione (e dunque degradazione) della caderina;
3. Il caso di **aumentata sintesi di metallo proteasi** che degradano le caderine;
4. Si può manifestare il fenomeno di **"caderin-switch"**, in cui gli stessi segnali che regolano l'espressione di caderine aumentano invece l'espressione di altre caderine che sono espresse per esempio da cellule mesenchimali.

Anche questi fenomeni quindi possono essere importanti nella transizione epitelio-mesenchimale che comporta un distacco dell'interazioni sane tra cellule epiteliali e un aumento del movimento dell'invasività e infine del processo metastatico vero e proprio.

Anche in questo contesto troviamo una proteina regolatrice importante di questi fenomeni rappresentata dalla **glicogeno sintasi chinasi 3 (GSK-3)**, che regola la fosforilazione in serina e treonina di β-catenine favorendone la degradazione, e anche la fosforilazione e degradazione di Snail che regola negativamente la trascrizione dei geni codificanti per caderine. Un'inibizione della GSK-3 si può avere da segnali che originano da recettori per fattori di crescita, attraverso la via PI3K-dipendente di **Akt**. Akt fosforila e inibisce GSK-3, determinando svariate conseguenze sul metabolismo, sulla glicogeno sintesi, sulla regolazione della trascrizione genica. Da sottolineare in particolare che GSK-3 è anche inibitore dell'ipertrofia cardiaca. In sintesi GSK-3 regola negativamente fenomeni trascrizionali importanti nel contesto di diverse risposte biologiche.

Questo fenomeno di regolazione della funzione della β-catenina da parte della GSK-3 ha un altro contesto, rappresentato da una via di trasduzione del segnale regolata da recettori GPCR; questi sono co-recettori (richiedono altre molecole) per un gruppo di fattori di crescita, che sono i **Wnt**, regolano la proliferazione cellulare; il loro bersagli sono β-catenina e GSK-3. In condizioni di riposo, in una cellula non proliferante, GSK-3 si trova in un **complesso multi molecolare** (slide 24, figura a) dove, interagendo con diverse molecole, fosforila la β-catenina e promuove la degradazione del proteosoma, quindi previene la migrazione della β-catenina nel nucleo e la regolazione della trascrizione genica. Di questo complesso fa parte anche la proteina APC (il cui gene è considerato un oncosoppressore), identificata come mutata nella poliposi adenomatosa familiare del colon. In sua assenza,! i segnali che portano a proliferazione cellulare alterano la struttura di questo complesso, cioè rimuovono la GSK-3, quindi impediscono la fosforilazione della β-catenina, la quale migra nel nucleo e, interagendo con altri fattori di trascrizione, detta la trascrizione di geni implicati in proliferazione e in sopravvivenza. La mancanza di APC rende questo complesso instabile, c'è uno spostamento dell'equilibrio verso la forma di β-catenina defosforilata. Vedi legenda.

Un'altra importante chinasi della famiglia del Src è la famiglia **Abl**, composta da due geni che codificano per Abl e Arg che sono ubiquitarie, seppur con differenze d'espressione nei diversi tessuti. Facendo comparazione con la famiglia Src, risultano molto simili: dominio chinasico, dominio SH2, SH3, e N-terminale in cui una delle isoforme di Abl è miristilata (così come il Src stesso

e altri membri della famiglia del Src sono anche palmitati). La grossa differenza tra Abl e Arg sta nel C-terminale, dove si trovano siti di interazione con proteine (come F-actina) oppure siti che mediano la localizzazione nucleare della chinasi, dove esercita una serie di funzioni.

Questa chinasi è storicamente importante come Src perché esiste una forma alterata che deriva da una proteina di fusione in cui Abl è legata all'N-terminale ad un'altra proteina che è **Bcr**. Questa fusione **Bcr-Abl** all'N-terminale rende non miristilabile l'Abl. Questa proteina di fusione Bcr-Abl è diventata famosissima in quanto è stata ritenuta responsabile da sola di una neoplasia chiamata leucemia mieloide cronica. Il link importante tra patologia molecolare e meccanismi molecolari di trasformazione neoplastica è dovuta al fatto che è stata dimostrata l'esistenza di una traslocazione tra il cromosoma 9 e 22. Il 9 contiene il gene Abl, il 22 il gene Bcr; c'è una breakpoint region che anticipa il fenomeno della traslocazione, la consistente parte terminale di Abl viene fusa con la sequenza iniziale di Bcr e si dete! rmina una fusione. Tale fusione è in-frame, cioè consente la trascrizione di un gene ibrido che dà origine a una proteina ibrida e di per sé in grado di indurre trasformazione neoplastica. In più del 90% delle leucemie mieloidi croniche è possibile documentare la traslocazione 9-22 e la fusione Abl-Bcr. Perché la traslocazione 9-22 e la fusione comportano trasformazione neoplastica? Perché è alterato un processo di regolazione intrinseca di questa tirosin chinasi che è dovuto a un ripiegamento della molecola nel quale è importante l'acido miristico, che dovrebbe legarsi sul dominio chinasico dell'Abl e ripiegarla in una conformazione chiusa, favorendo così interazioni di SH3 con la linked region e mantenendo Abl inattivata. Con la perdita dell'acido miristico, Bcr-Abl assume un conformazione lineare costitutivamente attiva, in cui la trasduzione del segnale è costant! emente generata. Oltre alla traslocazione e fusione si verific! ano una serie di mutazioni addizionali che poi fanno emergere dei cloni neoplastici con la caratteristica di blasti, sia linfoidi che mieloidi, iperproliferanti e molto aggressivi. Abl costitutivamente attiva trasduce una serie di segnali che sono mediati da questi fenomeni di docking che portano a diverse alterazioni cellulari.

Il secondo motivo per cui Abl è importante è il fatto che ha portato alla messa a punto della prima terapia anti-neoplastica specifica: una tappa storica, in quanto fino ad allora si usavano chemioterapici aspecifici. Tale terapia mirata fu basata, dopo aver osservato che Bcr-Abl è in grado di determinare di per sè la neoplasia, sulla scoperta di un farmaco **Gleevec** (STI571, Imatinib mesilato) che si lega al sito di legame per l'ATP della Bcr-Abl e inibisce la capacità della tirosin chinasi di fosforilare gli appropriati substrati. Questa terapia si è diffusa in origine come l'unica terapia non chirurgica curativa per un cancro umano, nel senso che i soggetti trattati con Gleevec vanno in remissione completa e l'efficacia del farmaco è tale che è difficile trovare, anche con metodi molto sensibili come la PCR, tracce della proteina di fusione. In pi&ugrav! e;, è un farmaco assunto per via orale, quindi facile da usare. Tuttavia nel tempo sono emerse delle complicanze: Abl e Arg sono espressi da diversi tessuti, ci sono bersagli di tossicità a livello cardiaco, alcuni pazienti vanno incontro ad alterazioni della funzione contrattile delle cellule muscolari cardiache; tutte queste evidenze impongono accorgimenti nell'uso del farmaco. La seconda complicazione più significativa che è emersa è che, estendendo l'uso del farmaco, alcuni pazienti non erano responsivi: in alcuni casi sin dalla prima somministrazione, in altri c'era un progressiva desensibilizzazione. Infatti una serie di mutazioni, preesistenti o acquisite, rendevano meno efficace il legame del Gleevec con l'Abl, che quindi rimane attivo e stimola la proliferazione cellulare. Questa evidenza ha stimolato la ricerca di farmaci sostituti; ne è emerso uno, il Dasatiniv, che inibisce l'Abl mutata, res! istente al Gleevec e inibisce anche Src e altri membri della s! tessa fa miglia, trovando pertanto applicabilità anche in altri tumori.

Trasduzione del segnale da parte di recettori immuni

Alcune tirosin chinasi citoplasmatiche sono essenziali nella trasduzione del segnale da parte dei recettori immuni. Sono recettori implicati nel riconoscimento delle molecole dell'immunità e comprendono i **TCR** e **BCR**, centro dell'immunità adattativa per il riconoscimento di molecole a struttura specifica, ma anche recettori per immunoglobuline, come **FcεRI**, il recettore delle IgE, la cui interazione è implicata nelle patologie allergiche, e **FcγR**, del quale esistono diverse classi che sono per le IgG, coinvolte nel fenomeno della fagocitosi. Questi recettori hanno dei domini caratteristici nella parte extracellulare: i domini Ig-like, domini di centinaia di amminoacidi, ai cui estremi sono presenti delle cisteine che mediano la formazione di un ponte disolfuro. Nella coda citoplasmatica invece è presente una sequenza **ITAM (Immuno-receptor Tyrosin-based Activation Motif)**: si susseguono una tirosina, due amminoacidi differenti, leucina o isoleucina e, dopo un numero ben definito di altri amminoacidi differenti, questa sequenza si ripete (**Y**xxL/I(x)$_{6\text{-}7}$**Y**xxL/I). Questa sequenza è essenziale nella trasduzione del segnale da parte di questi recettori. Nella gran parte di questi recettori è presente non nella coda citoplasmatica del recettore stesso, ma nella coda citoplasmatica di molecole associate al recettore. TCR è associato a diverse molecole che sono omo/eterodimeri che vanno a costituire il CD3; il BCR è associato a eterodimeri di Igα e β e invece tutti i recettori Fc sono associati a omodimeri γγ che presentano sequenza ITAM. Eccezione: recettore presente a elevata concentrazione nei neutrofili, che è l'**FcγRIIA** che ha la sequenza ITAM nella coda cito! plasmatica del recettore. Questo è speculare al fatto che il FcγRIIB ha nella coda citoplasmatica una **sequenza ITIM (Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibitory Motif)**, che è in grado di generare segnali inibitori nelle cellule del sistema immunitario. Molti studi che dimostrarono che man mano che la risposta immunitaria è stimolata, ci sono complesse interazione tra linfociti B e T, differenziazione in plasmacellule e secrezione di abbondanti quantità di immunoglobuline; quest'ultime si legano ai recettori sui linfociti e bloccano l'attivazione e differenziazione in plasmacellule. È un naturale meccanismo di feedback negativo, per evitare l'eccessiva produzione di immunoglobuline. Ci sono anche molte molecole sulle superfici delle cellule delle difese innate e adattative che hanno sequenze ITIM e che quindi possono regolare questa complessa risposta (ruolo nelle patologie autoimmunitarie).

Un evento centrale nella trasduzione del segnale da parte delle cellule immuni è che a queste sequenze ITAM si legano delle tirosina-chinasi(**Syk** oppure **ZAP70**) che hanno due domini SH2 che si legano alle due tirosine fosforilate, questo distanziamento tra le due tirosine è adeguato per l'interazione tra i due domini SH2 di SYK o ZAP70. Il legame alle tirosine fosforilate determina

una modificazione conformazionale e attivazione di queste chinasi, che possono anche essere attivate da altre chinasi della famiglia del Src che oltre ad essere essenziali per fosforilare le tirosine della sequenza ITAM, ma sono anche essenziali per fosforilare e iper-attivare Syc e ZAP70. Il crosstalk tra Src chinasi e Syk o ZAP70 è essenziale per la trasduzione del segnale da parte di recettori immuni in generale.

Precisazioni: il segnale in TCR è mediato da ZAP70, mentre il segnale negli altri recettori è mediato da Syk. Le chinasi della famiglia di Src implicate in questa trasduzione del segnale sono, per TCR, Fyn e Lck. Quest'ultima è ancorata alla molecola implicata nel riconoscimento dell'antigene (ossia il CD4 per i T helper e CD8 per i CTL); per BCR è Lyn, che fosforila ITAM e attiva Syk; per i recettori Fc abbiamo Lyn, Hck e Fgr, importanti nella fagocitosi.

Il **modulo Src-ITAM-Syc** è emerso negli ultimi anni coinvolgere un'altra classe di recettori, particolarmente importanti per l'immunità innata. Sono chiamati **C-type lectins** in quanto sono recettori che riconoscono residui di carboidrati complessi presenti sulle superfici di patogeni (es. CLEC5A per virus, CLEC7A per β-glucano dei funghi). La particolarità di questo sistema è rappresentata dal fatto che mentre alcune C-type lectins sono associate a molecole importanti nella trasduzione del segnale (es FcγR o DAP12, analogo), il recettore per il β-glucano invece ha un solo residuo di tirosina nella coda citoplasmatica; la sequenza venne dunque chiamata emi-ITAM, in cui una sola tirosina è fosforilata, di conseguenza è importante che questi recettori si associno a creare due tirosine fosforilate affiancate, a una distanza adeguata. Anche in quest! o contesto, la fosforilazione di queste sequenze dipende da chinasi della famiglia del Src; questo modulo di trasduzione del segnale Src-Syk è diventato importantissimo nelle risposte delle cellule delle difese innate a molti patogeni come i lieviti, il *Mycobacterium tubercolosis,* alcuni virus ecc.

Come vengono attivate le chinasi della famiglia del Src da questi recettori?

Questi recettori si trovano distribuiti in regioni particolari della membrana plasmatica, chiamate **lipid raft**, ricche di sfingolipidi, colesterolo, glicerofosfolipidi. Questi sub-domini lipidici della membrana, idrofobici, sono siti di ancoraggio ottimali per chinasi della famiglia del Src, che attraverso la coda di acido miristico e palmitico si vanno a localizzare prevalentemente in questi domini lipidici. La trasduzione del segnale poi coinvolge una serie di proteine adattatrici che sono implicate in questo fenomeno. Riassunto che ci riporta al modello della trasduzione del segnale da parte dei recettori di crescita, e in particolare dal recettore insulinico: qui (slide 44) si vede come un recettore TCR che lega chinasi citoplasmatiche, le quali fosforilano, analogamente all'IRS delle proteine adattatrici come per esempio nel caso dei linfociti T il Lat, che viene fosforilato in diversi residui di tirosina, implicati ! nell'attivazione di diverse vie. Uno lega la PLCγ e quindi abbiamo PKC, IP3 e calcio; un altro lega il Grab2 e quindi Sos e quindi Ras che può essere attivato anche da RasGRP (che è un GEF attivato da DAG) e quindi dalla cascata delle MAPK e quindi della proliferazione e espansione clonale di linfociti che hanno riconosciuto un determinato antigene; poi c'è tutta una via che coinvolge una serie di molecole come le Rho GTPasi, cioè Rac e Cdc42, quindi un riarrangiamento del citoscheletro che ha diversi ruoli oppure attivazione di JNK e p38.

In questo contesto, recentemente è emerso un **ruolo anche di Abl** che nel caso dei linfociti T è fosforilato da Lck, questo comporta un'attivazione di Abl che è in grado di fosforilare e attivare ZAP70. C'è quindi un cross-talk complesso e importante tra diverse chinasi per quanto riguarda questo tipo di risposte.

L'ultima parte di questa storia, comporta la necessità di ritornare alla questione delle **sequenze ITIM**, che, come nel contesto del recettore FcγRIIB dei linfociti, sono importanti anche nel contesto di altri recettori. Queste sequenze ITIM legano delle **fosfatasi**, che rientrano in due gruppi: **1) lipide-fosfatasi** e **2) protein-fosfatasi**. 1) Ci riportano a una fosfatasi nominata nel contesto del PI3K-depending signalling, sono **SHIP1** e **SHIP2** che defosforilano il PIP_3 in posizione 5, quindi formano la 3,4-PIP_2 e questo ha un'affinità per proteine con dominio PH molto minore rispetto al PIP_3. Quindi il legame delle lipide-fosfatasi spegne tutto ciò che PI3K-dipendente. 2) **SHP1** e **SHP2** sono invece protein-fosfatasi, e quindi defosforilano proteine,! hanno diversi bersagli tra cui la stessa ZAP70 ad esempio, e la defosforilazione comporta un'inibizione di questo circuito di attivazione. Questa via inibitoria è stata particolarmente caratterizzata nel contesto delle cellule NK, per cui sono molto importanti i segnali inibitori che si basano sul riconoscimento di molecole MHC del self, quindi impediscono le cellule NK di uccidere le cellule dell'organismo.

Questo **modulo Src-ITAM-Syk** è stato recentemente enfatizzato anche **nel contesto del segnale insulinico**. Le integrine β2 e 3 possono trasdurre un segnale basato sul fatto che le integrine attivano Src chinasi che fosforilano ITAM presenti nel Fcγ o nel DAP12 che lega Syk e che quindi amplifica la trasduzione del segnale.

PATOGENESI DELLE LESIONI ATEROSCLEROTICHE

Abbiamo visto che **l'aterosclerosi è una lesione focale delle arterie di medio e di grosso calibro**, dovuta a un'infiltrazione di lipidi e all'innesco da parte dei lipidi che si adsorbono all'intima vascolare di un processo infiammatorio.

Questa è la definizione più esaustiva, che definisce tale patologia come una malattia infiammatoria potenzialmente letale caratterizzata da un'intensa attività immunologica che comporta infiammazione, accumulo di lipidi, morte cellulare e fibrosi. È una lesione infiammatoria con le caratteristiche di una lesione di tipo cronico; molto dinamica, acquisisce col tempo diverse caratteristiche che la rendono più o meno rilevante dal punto di vista clinico. La struttura generale di una lesione aterosclerotica è che c'è un core in cui ci sono cellule apoptotiche, detriti, accumuli di lipidi, cristalli di lipidi e diversi tipi di cellule infiammatorie, tra cui i **neutrofili**. Si tratta dunque di una tipica **lesione infiammatoria**. Questa lesione è leggibile nel contesto di una serie di

danni alla superficie dell'endotelio; questi danni sono dovuti a! diversi fattori (fattori di rischio per lo sviluppo di lesioni aterosclerotiche). L'aspetto centrale emerso nel tempo è che tutti i fattori di rischio per lo sviluppo di lesioni aterosclerotiche aggravano l'effetto di aumento delle LDL circolanti, considerato il fattore causale della malattia. Come ricordate, un aumento di colesterolo intracellulare riduce l'espressione del recettore per le LDL e quindi riduce la rimozione delle LDL dal circolo e determina un aumento del fattore causale, rappresentato da questo aumento delle LDL. L'efficacia di queste nell'indurre lesioni aterosclerotiche dipende anche da tutti gli altri fattori di rischio (fumo, ipertensione, ecc.) che favoriscono quel danno endoteliale che promuove l'adsorbimento di lipoproteine nell'intima vascolare.

Nella formazione delle lesioni aterosclerotiche l'evento centrale è questa alterazione endoteliale indotta da **lipoproteine ossidate** e dall'accumulo di queste che, attraverso scavenger receptor di tipo A e CD36, inducono la formazione di **foam cells** (cellule schiumose) e di cellule che hanno anche un'attività pro infiammatoria e mantengono il processo infiammatorio.

La lesione aterosclerotica passa attraverso diverse tappe, leggetele (slide 8).

Questa figura (slide 9) mostra l'evidenza che, bloccando il reclutamento di monociti nell'intima vascolare, si riduce lo sviluppo di lesioni aterosclerotiche. L'attivazione dei geni codificanti per proteine implicate nel reclutamento monocitario riducono lo sviluppo di lesioni aterosclerotiche in quei topi con inattivazione genica di ApoE o LDL receptor che sviluppano aterosclerosi. X significa knock-out del gene che blocca il reclutamento leucocitario.

La lesione aterosclerotica è in sintesi una lesione parainfiammatoria, indotta dall'accumulo delle lipoproteine ossidate nell'intima vascolare e il reclutamento di monociti non fa che mantenere questa situazione infiammatoria.

Questo reclutamento cellulare e accumulo di lipidi è oggi visto in una forma molto dinamica che ha permesso di schematizzare uno spettro di lesioni, che può essere molto variabile, tra due lesioni principali. A uno dei due estremi di questo spettro c'è la lesione **vulnerabile**, caratterizzata da una sottile cappa fibrosa, da un grosso accumulo di lipidi e da un grosso accumulo di cellule infiammatorie. Questa lesione va incontro a una quantità maggiore di complicanze: determina fenomeni di formazione del trombo, quindi necrosi acuta cioè infarto del tessuto a valle della lesione oppure, per indebolimento della parete, determina la rottura del vaso e quindi emorragia, come può succedere nei vasi cerebrali. Dall'altra parte c'è una lesione, che è stata studiata, che è una placcadefinita **stabile**: in questa c'è invece ! un basso accumulo di lipidi, un basso numero di cellule e una cappa fibrosa tra la lesione e l'endotelio, nel contesto dell'intima, più spessa. Questa cappa stabile, può avere ripercussioni sul lume del vaso determinando una riduzione del lume, però ha sicuramente conseguenze cliniche minori. A questa placca stabile, si può arrivare sia attraverso un ateroma precoce, sia attraverso la placca vulnerabile. Questa distinzione è importantissima dal punto di vista dell'approccio verso le lesioni aterosclerotiche, che è basato sul fatto di eliminare le complicanze (trombosi, rottura del vaso). L'approccio importante oggi è quello di **ridurre la formazioni di queste lesioni vulnerabili**, in due modi: 1) riportando le LDL a valori bassi, attraverso l'uso di farmaci che riducono le LDL circolanti perché riducono il pool di colesterolo intracellulare e l'espressione di recettori! ; 2) di recente, riducendo la componente infiammatoria della placca aterosclerotica.

Tabella (slide17) che elenca gli approcci emergenti per trattare malattie cardiovascolari basate su lesioni aterosclerotiche: elencati approcci non ancora usati su larga scala, ma ci sono sperimentazioni in corso, usate nelle malattie infiammatorie croniche come l'artrite reumatoide, il lupus o la sclerosi multipla. C'è un possibile link nel trattare la lesione aterosclerotica come una vera patologia infiammatoria usando questi nuovi farmaci che stanno emergendo.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 4/12/2012

Valentina Schiavone

Patologia generale e fisiopatologia clinica

Prof. Cassatella

04/12/2012

Meccanismi battericidi e derivati tossici dell' ossigeno

[Riprende ciò che ha detto nella lezione precedente, NdR]

La NADPH ossidasi è quel complesso enzimatico espresso in maniera specifica dai linfociti, compresi i neutrofili. Questo enzima è composto da una serie di componenti alcuni dei quali si ritrovano nel citoplasma ed altri a livello della membrana.

In questa immagine*[si riferisce alla prima diapositiva della lezione, NdR]* si mostra che la localizzazione di alcune di queste componenti è mista:

Il citocromo B può trovarsi sulla superficie della cellula o all'interno delle vescicole di alcuni granuli contenuti all'interno dei granulociti neutrofili. Il sistema nelle cellule che non sono state stimolate non funziona; funziona solamente quando la cellula è stimolata da un mediatore di varia natura. "Qualsiasi" fattore "tocchi" il neutrofilo alla fine porta alla stimolazione della NADPH ossidasi, il quale è un sistema molto sensibile, e l'attivazione consiste nell'assemblaggio dell'enzima, ossia la traslocazione delle componenti citosoliche sulla membrana dove si trova il citocromo B.

Il sistema si assembla e si attiva, riducendo l'ossigeno con produzione di anione superossido(**O_2^-**) . **L' O_2^-** è il composto che viene prodotto direttamente dalla NADPH ossidasi . L' O_2^- è una sostanza tossica per il bersaglio, cioè i batteri.

Questa produzione di radicali liberi dell'ossigeno da parte della NADPH ossidasi -o meglio dell'**O_2^-** che viene successivamente metabolizzato in una serie di vie di diversa natura rientra- nei **meccanism**i definiti **battericidi o anche citocidi** -essendo utilizzati anche per uccidere le cellule tumorali se prodotti in grandi quantità- ossigeno-dipendenti, esistendo anche meccanismi ossigeno-indipendenti.

Quindi esistono due **meccanismi battericidi o citocidi**:

- il primo ossigeno-dipendente, che dipende dall'attivazione della NADPH ossidasi dei fagociti

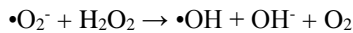
-il meccanismo ossigeno-indipendente, che corrispondono alle sostanze tossiche ed enzimi contenuti nei granuli dei neutrofili che vengono scaricati quando la cellula si attiva all'interno del vacuolo fagocitario.

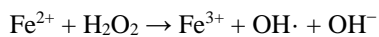
I composti tossici dell'ossigeno sono definiti **ROS** (Reactive Oxygen Species) o **ROI** (Reactive Oxygen Intermediate).

Qui vedete*[si riferisce a una diapositiva mostrata a lezione, NdR)* la NADPH ossidasi che si attiva e produce **l'anione superossido(O_2^-)**; questo da una parte è tossico, anche se meno tossico degli altri, dall'altra parte molto labile perché si può decomporre. Viene immediatamente trasformato dalla SOD (Superoxide Dismutase) in **H_2O_2** (**perossido di idrogeno** o **acqua ossigenata**). Il primo composto che deriva dall'O_2^- è l'**acqua ossigenata**, composto molto tossico per i batteri tant'è che viene utilizzato come disinfettante. L'O_2^- deriva per riduzione dell'ossigeno con un elettrone ceduto dalla NADPH. L'acqua ossigenata deriva da dismutazione di due molecole di superossido.

Anche l'acqua ossigenata è un composto molto instabile; può venire rapidamente degradato da certi sistemi che servono anche alla cellula per proteggersi dagli effetti tossici della sostanza stessa oppure può essere rapidamente metabolizzata normalmente

attraverso **la reazione** definita **di Haber- Weiss** In questa reazione una molecola di **superossido** reagisce con una molecola di **acqua ossigenata** per formare **ossigeno molecolare**, **acqua** e un **radicale idrossile** -uno dei ROS più tossici.

$\bullet O_2^- + H_2O_2 \rightarrow \bullet OH + OH^- + O_2$

Poi c'è una reazione analoga definita **di Fenton** che necessita di per la sua catalisi del ferro ridotto che poi cede l'elettrone diventando ferro ossidato.

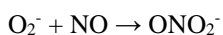
$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH\cdot + OH^-$

[si riferisce alla diapositiva successiva]

Si attiva la NADPH ossidasi all'interno del vacuolo fagocitario contenente il microrganismo. Il vacuolo può fondersi con il lisosoma formando il fagolisosoma, all'interno del quale si scaricano gli enzimi contenuti nei granuli, che a loro volta partecipano alla degradazione della particella fagocitata. Possono farlo sia direttamente sia perché collaborano con la NADPH ossidasi, in quanto la mieloperossidasi può interagire con l'acqua ossigenata in presenza di un alogeno -come mostra la figura- per formare **l'acido ipocloroso** (che può diventare ipoclorito) o varechina, sostanza molto tossica usata come disinfettante. Questa è un'altra sostanza tossica che rientra nei meccanismi ossigeno-dipendenti**. HOCl (Acido ipocloroso)** a sua volta può ulteriormente essere degradato a **ossigeno singoletto**, una molecola di ossigeno molecolare -che insieme all'ossigeno molecolare è uno dei composti molto tossici. Questi sono comporti tossici derivati dal metabolismo dell'ossigeno.

Poi l'acido ipocloroso può essere ulteriormente metabolizzato da altri sistemi per cui si formano prodotti secondari come cloramine e aldeidi, anch'esse sostanze tossiche.

Qualche anno fa si è scoperto un altro radicale dell'ozono -l'ossigeno trimolecolare- uscito in una pubblicazione del 2003/2004 su Scienze: questo gruppo avrebbe dimostrato che qualche meccanismo ancora poco conosciuto anticorpi sulla superficie dei linfociti B sarebbero in grado di catalizzare la formazione di ozono, a sua volta composto molto tossico. Questo lavoro non è stato però più seguito dai gruppi -ogni tanto ci sono dei risultati non riprodotti da altri. Anche questo comporto ha potenzialità tossica.

Invece un altro composto tossico che in questo caso deriva dall'interazione del sistema della NADPH ossidasi con il sistema che deriva dal metabolismo dell'azoto; i fagociti -soprattutto i macrofagi in questo caso- possono esprimere il coenzima che si chiama nitrossido sintasi inducibile che produce un composto a sua volta molto tossico per i batteri -soprattutto intracellulari- detti **perossinitriti**. Quindi **l'anione superossido** ,prodotto dalla NADPH ossidasi, e **l'ossido nitrico** possono interagire per dare origine a questi **perossinitriti** che sono i composti più tossici di tutti per questa categoria di batteri. C'è questa collaborazione tra i ROS e i derivati tossici del metabolismo dell'azoto -i **perossinitriti. Il perossinitrito** è un agente ossidante-nitrante e in vivo la reazione deriva dalla interazione tra superossido e ossido nitrico. Quindi altro composto appunto tossico.

$O_2^- + NO \rightarrow ONO_2^-$

Quindi queste sono sostanze che i fagociti -neutrofili, monociti, macrofagi- utilizzano per uccidere e degradare i composti fagocitati o quello per cui la cellula è stimolata. Sono prodotte come meccanismi di difesa. Naturalmente ci devono essere anche sistemi di protezione da parte della cellula affinchè queste sostanze tossiche vengano eliminate e degradate; quindi la superossido

dismutasi degrada rapidamente l'anione superossido degradandolo in **acqua ossigenata**. Questa può essere degratada da vari sistemi tra cui le catalasi e dal sistema delle glutatione perossidasi di cui i fagociti sono molto ricchi. I fagociti devono potersi proteggere ovviamente da questa produzione massiva di ROS, quindi esprimono ad alti livelli questi enzimi di degradazione. L'altra sostanza scavenger, quindi che lega e favorisce la degradazione, è questa amina molto espressa dai neutrofili per esempio che lega l'acido ipoclorosa e lo trasforma in un altro composto poco tossico che viene eliminato. Quindi i fagociti hanno uno di questi sistemi di protezione da queste sostanze tossiche, anche se poi ad oggi il ruolo e la funzione di questi radicali liberi è molto dipendente dal contesto, dalla quantità, dal tipo di cellula, dall'ambiente ecc. Possono anche uccidere le cellule dei fagociti stessi.

Poi ci sono **meccanismi ossigeno- indipendenti**, oltre i radicali dell'ossigeno, alcuni dei quali sono elencati in questa tabella *[si riferisce a una diapositiva]*. In sostanza sono meccanismi che dipendono dall'azione di tutte quelle molecole- soprattutto enzimi e proteine- contenute nei granuli dei fagociti.. Ad esempio il lisozima, la lattoferrasi -enzimi in grado di attaccare proteine- idrolasi, fosfolipasi, nucleasi. Quindi tutti enzimi che attaccano bersagli.Lactoferrina , altra proteina che lega il ferro contenuta nei granuli e lo sequesta -il Fe per certi batteri è importante per la replicazione Proteine cationiche -cariche positivamente; Proteine citotossiche.Altre proteine dette BPi con azione simil -antibiotica quindi interferiscono con alcune tappe della replicazione e del metabolismo dei microrganismo che servono loro per replicarsi. Il pH acido e nel caso degli eosinofili proteine specifiche come la proteina basica fondamentale per l'uccisione dei parassiti. Ce ne sarebbero anche altri come in certe situazioni le citochine ad azione tossica. Un esempio le proteine cationiche possono essere attratte dalle cariche negative dei batteri -in questo caso dei batteri con LPS a catena corta-, si attaccano ai batteri e favoriscono la degradazione della membrana esterna con lisi batterica.

Questa figura*(si riferisce a una diapositiva mostrata a lezione)* illustra alcuni dei meccanismi microbicidi utilizzati dai fagociti, cellule specializzate per fagocitare particelle estranee e microrganismi, internalizzarli, racchiuderli in compartimenti intracellulari (fagosomi e fagolisosomi) e all'interno di questi compartimenti scaricare le sostanze tossiche con azione che determina uccisione ed eliminazione del microrganismo fagocitato. La NADPH ossidasi produce radicali dell'ossigeno, la idrossido sintasi inducibile espressa dai fagociti (normalmente i fagociti non hanno questo enzima, se ce l'hanno a bassissimi livelli). L'espressione deve essere indotta. Contenuti nei granuli e scaricato nel fagolisosoma.

La dimostrazione dell'importanza di questo meccanismo, cioè la produzione di ROS come sistema di difesa utilizzato dai fagociti è che esiste una malattia ereditaria detta **CGD (malattia granulametosa cronica).** In questa patologia rara -un pò come tutte queste patologie ereditarie, al mondo 500/600 casi diagnosticati- il respiratory burst è difettoso: in poche parole, soggetti portatori di queste mutazioni non sono in grado di esprimere la NADPH ossidasi e di produrre radicali liberi dell'ossigeno.

In questa tabella*(diapositiva mostrata a lezione)* si illustrano disorders of leucocite funtion. Ci sono le LAD. Esistono -come inciso- una serie di patologie ereditarie genetiche il cui difetto va ad interessare le fasi che riguardano il reclutamento e l'attivazione dei fagociti durante la risposta infiammatoria acuta e queste patologie che ci aiutano ancora non conosciamo queste il significato biologico però in generale aiutano a capire il ruolo di determinati sistemi a livello della funzione dei linfociti B importante per la produzione dei radicali liberi dell'ossigeno.

In questa patologia, **la CGD**, a causa della mutazione di uno dei componenti del sistema enzimatico il risultato finale sarà che non vi è la produzione di O_2^- e quindi dei radicali liberi dell'ossigeno, perché manca il sistema di difesa in questi pazienti, quindi potete immaginare le conseguenze.

Qui vedete*(si riferisce a una diapositiva mostrata a lezione)* la frequenza quali sono i componenti che possono essere mutati, in pratica diciamo che più frequenza colpiti sono la **gp91** quindi una subunità che compone il citocromo B della membrana. Vedete che è interessato per il 60-80 % delle mutazioni il cui gene è sul cromosoma X. E' una malattia legata quindi al cromosoma X. E' stata la prima patologia utilizzata per “reverse genetics”: è' stata prima individuata la mutazione e dopo la proteina responsabile, invece che l'opposto. Dopo si è capito che cromosoma X codificava proteina per questo componente enzimatico però al tempo si pensava che NADPH ossidasi fosse un unica proteina e non catena di diversi componenti.

Quindi più frequente è la malattia legata al cromosoma X con tutte le varie caratteristiche -che dovete sapere e l'altra forma più frequente è invece la cadenza per difetto genetico della produzione della **p47Fox** in questo caso è patologia autosomica recessiva sul cromosoma 7 per 20%. Il rapporto maschio –femmina è 4/6 : 1.

Fino a qualche anno fa non si conoscevano mutazioni genetiche della p40 tanto che qualcuno diceva che la p40 non fosse una componente essenziale dei sistema, ma proteina semplicemente regolatrice che favorisce le interazioni. In realtà non è così, nel 2009 è uscito un lavoro. 4/5 casi individuati con mutazione autosomica recessiva del **p40 fox**, quindi anche questa sicuramente fa parte degli elementi della NADPH ossidasi ed è importante per assemblaggio del sistema. Non solo, ma l'identificazione di questo sottotipo di **CGD** ha permesso di capire come funziona questa NADPH ossidasi nel senso che in questo tipo di mutazione è difettosa la NADPH ossidasi che funziona all'interno del fagosoma e non quella sulla superficie quindi forse esistono pool diversi di componenti del sistema che a seconda dell'attivazione della cellula funzionano all'interno del fagosoma oppure sulla superficie cellulare. E' stata la scoperta di questo sottotipo ad aumentare le problematiche legate a questa NADPH ossidasi.

Sono state poi mappate tutte le mutazioni che si conoscono, essenzialmente queste mutazioni possono compire diversi domini della proteina per quanto riguarda la **gp91.**

Cosa si aspetta uno da una patologia di questo tipo in cui i fagociti non sono in grado di produrre ROS? Ci sono varianti cliniche in cui non si ha l'assenza completa della produzione; varianti in cui le cellule possono produrre fino al 5% di quella che è la loro potenzialità totale e questi soggetti tutto sommato stanno bene. Questo ci dice che in realtà basta un piccolo funzionamento della NADPH ossidasi per proteggerci dal punto di vista omeostatico. Poi anche questi soggetti possono subire infezioni gravi perché ci sono delle mutazioni minori che permettono in ogni caso la sintesi di una proteina che è in grado di assemblare e funzionare bene. Sono soggetti che rispondono bene al tipo di terapia che vediamo.

Comunque **nella CGD** classica ci aspettiamo che i soggetti siano incapaci di difendersi da infezioni- infatti così è. Sono soggetti ad alto rischio perché se infettati non son in grado di eliminare i patogeni. Aspetti clinici su soggetti gravissimi che adesso con gli antibiotici possiamo curare mentre prima morivano in età infantile.

Vedete gli **aspetti clinici** i soggetti presentano una serie di infezioni localizzate in vari distretti: polmoniti da funghi, batteri, ascessi epatici, granulomi, infezioni dei linfonodi, infezioni ripetute che si protraggono nel tempo e che non vengono eliminate e quindi si instaura un'infiammazione cronica per cui si formano questi granulomi, espressione di un'infiammazione cronica, perché gli agenti patogeni non vengono eliminati e quindi ci sono queste strutture -granulomi- che sono nuovo tessuto formato da macrofagi che da una parte circoscrive e che tentano di eliminare questi agenti patogeni. I ROS non sono prodotti per cui c'è un difetto.

Qua vedete quali tipo di infezione; patogeni più comunemente infettano questi soggetti: funghi come Aspergillus e Batteri compresi Micobatteri. Quindi si possono presentare anche con la diagnosi se si tratta di bambini piccoli anche in età adulta granulomi all'intestino e magari sotto c'è **CGD** che produce bassi radicali liberi dell'ossigeno. Quindi dal punto di vista patogenetico l'idea era e continua ad essere che i sintomi clinici dipendessero dal fatto che i fagociti non producono ROS e quindi mancherebbe uno dei sistemi di difesa e d'uccisione degli agenti patogeni.

Nel frattempo sono uscite altre spiegazioni patogenetiche che aiutano a comprendere come mai si formano i granulomi. un lavoro pubblicato su Nature in cui autori -studiando topo knock out per forse gp47- hanno scoperto che l'anione superossido prodotto dalla NADPH ossidasi probabilmente in questo modello interagisce con il metabolismo del triptofano. Quindi attiva questo enzima –IDO - a sua volta attivato dall'interferone gamma, interagisce con il metabolismo del triptofano favorendolo, e quindi crea la via utilizzata dal linfociti T che fisiologicamente favorisce lo spegnimento dell'azione e della formazione dei linfociti T effettori (TH17 e TH1 altamente pro- infiammatori) e dall'altra parte favorisce l'attivazione dei linfociti T regolatori

.Quindi è identificato un ruolo nuovo dei radicali liberi dell'ossigeno, tantissimi e svariati a seconda dall'ambiente e dal sistema.. In questa situazione i radicali sono importanti per spegnere le attività pro-infiammatorie dei linfotici T effettrici specifici e favoriscono la formazione dei T regolatori con azione soppressoria. Quindi contrariamente a quello che uno si aspetta, ma in realtà è così in tanti sistemi, la produzione di radicali liberi dell'ossigeno da NADPH ossidasi se tutto procede come deve sarebbe molto importante non solo come meccanismo difensivo ma favorirebbe quella che si chiama "inflammation resolution" cioè chiusura processo infiammatorio. Se mancano questi radicali liberi dell'ossigeno perché il soggetto presenta mutazioni, questa seconda fase del processo di chiusura dell'infiammazione non c'è e quindi il processo continua, cronicizza e si formano i granulomi. Quindi tutto questo è stato dimostrato nel topo con utilizzo della tecnica del knock-out e nell'uomo non c'è ancora evidenza, ma potrebbe anche essere così.

Poi c'è come vedremo un'altra azione importante esplicata dai radicali liberi dell'ossigeno che interviene nell'attivazione di vari meccanismi identificati negli ultimi anni che servono per eliminare agenti patogeni ed è la formazione di **NET** (Neutrophil Extracellular Traps) , ossia la capacità di neutrofili di rilasciare la cromatina quando queste cellule sono attivate. Rilascerebbero la cromatina all'esterno, si formerebbero reti di cromatina (NET) che intrappolerebbero i batteri. Siccome insieme alla estruzione di acidi nucleici i neutrofili rilascerebbero i contenuti dei granuli, queste reti contengono DNA al quale si legherebbero gli enzimi dei granuli. Batteri intrappolati verrebbero distrutti dai sistemi enzimatici all'esterno della cellula. Quindi ci sarebbe meccanismo intracellulare legato alla fagocitosi e meccanismo di uccisione extracellulare grazie alla liberazione di reti di DNA. Sembra che la NADPH ossidasi e la produzione di ROS -soprattutto superossido- sia un fenomeno importante che favorirebbe il rilascio di queste reti.

Quindi la carenza di produzione di O_2^- impedirebbe il rilascio e la formazione di questi NET e quindi abbiamo un altro meccanismo di uccisione mancante di batteri extracellulari a livello extracellulare.

Tra i vari meccanismi patogenetici che in questi soggetti spiegherebbero i sintomi clinici, cioè la cronicizzazione dell'infezione con formazione granulomi. Incapacità di produrre radicali dell'ossigeno, quindi di uccidere determinati batteri, in conseguenza anche all'impossibilità da parte dei neutrofili di rilasciare i NET e anche la perdita di questo meccanismo di interazione con il sistema immunitario specifico che porterebbe alla risoluzione dell'infiammazione. Tutto questo porta a cronicizzazione e formazione granulomi.

Questi soggetti sono trattati con antibiotici vita natural durante. Oltre a profilassi antibiotica si da 15 anni circa si da anche profilassi con interferone gamma, citochina importante prodotta da TH1 che mediano l'immunità cellulo-mediata contro i patogeni intracellulari. E' citochina che orchestra immunità cellulo-mediata contro patogeni intracellulare. Interferone gamma ha anche la capacità di potenziare la capacità dei fagociti di produrre radicali liberi dell'ossigeno e la NADPH ossidasi.

In questa figura[*tabella che mostra la produzione di acqua ossigenata nei neutrofili in 3 situazioni, mostrata a lezione*] vedete il rilascio di acqua ossigenata da parte dei neutrofili in 30 minuti; neutrofili pre-incubati con diverse concentrazioni in vitro di interferone gamma e vedete che l'interferone gamma non fa niente e non modula niente. Lo stesso neutrofilo incubato con diverse concentrazioni di interferone gamma per certo periodo di tempo e stimolato con FMLP -peptide chemiotattico rilasciato dai batteri e che può essere utilizzato in laboratorio per stimolare le funzioni dei neutrofili.

Fa vedere quest'esperimento che senza IFN- γ questo rettangolo rappresenta la produzione di acqua ossigenata in 30 minuti da parte dei neutrofili. Se cellule pre- incubate con IFN-γ c'è effetto dose dipendente di potenziamento per quanto riguarda la produzione di acqua ossigenata. Con 10 unità –che sono bassissime- la capacità del neutrofilo di produrre $H_2 O_2$ va da 0.5 a 1.6, quindi triplica. E' la stessa cellula che è stata pre –incubata con IFN- γ per un certo periodo di tempo in cui IFN-γ non agisce; la cellula cambia la capacità di produrre radicali liberi dell'ossigeno con un altro stimolo, come la leptina. Quindi l'IFN-γ è in grado di modulare la capacità della cellula di produrre radicali liberi dell'ossigeno. Da solo non fa niente; ossia non induce la produzione

di radicali. Però la cellula sottoposta a questa citochina –ce ne sono anche altre- quando viene stimolata da stimoli capaci di determinare il funzionamento dell’enzima è molto più potente – risulta “drogata”.

[diapositiva successiva, relativa ad un diverso esperimento]

Vedete qua neutrofili incubati per 4 ore in 50 unità di IFN-γ, stimolate in queste situazioni, producono il doppio dell’acqua ossigenata. L’IFN-γ è in grado da una parte di potenziare i segnali di trasduzione utilizzati da queste sostanza per attivare la NADPH ossidasi, dall’altra induce la biosintesi degli componenti. Quindi una cellula sottoposta all’IFN-γ produce più molecole di enzima. Avendo più enzima, a parità di stimolazione produrrà più superossido, acqua ossigenata, ecc. Ecco perché ad un certo punto si è iniziato ad utilizzare l’IFN-γ prima come terapia, che funzionava soprattutto in quei soggetti di cui parlavo prima ossia soggetti che non hanno una mutazione che provoca la perdita completa della proteina X ma in cui un pò di enzima continua ad esserci. Quindi a questi soggetti l’IFN-γ dava risposte positive. Però ovviamente l'IFN-γ non può aumentare l'enzima se c'è una mutazione genetica che impedisce la sintesi; nonostante tutto l'IFN - in molti di questi soggetti funziona. I soggetti trattati con IFN-γ hanno una diminuita frequenza di infezioni. Quindi vuol dire che in realtà il meccanismo attraverso il quale l'IFN-γ funziona in questi soggetti non sarà perché agisce a livello dell'enzima, perché se c'è una mutazione l'enzima non è presente, ma perché l'IFN-γ è una citochina in grado di innescare tutti i meccanismi dell'immunità cellulo-mediata e quindi grazie a questi favorirà una migliore risposta alle infezioni.

Tutto questo discorso per dire che partendo dall'osservazione in vitro, identificando un presunto meccanismo molecolare alla base di questo si è passato all'uso terapeutico dell'IFN-γ su questi soggetti, ma in realtà il meccanismo non era quello scoperto in vitro ma un altro. E questo succede spesso per tanti farmaci che vengono scoperti in vitro dimostrandosi efficaci, passano attraverso una fase clinica ma poi si scopre che il meccanismo non è quello scoperto in vitro ma un altro. Comunque l'IFN-γ viene utilizzato come profilassi e funziona anche se ha un costo molto elevato.

Detto questo questi ROS abbiamo visto hanno una serie di effetti; sono molto importanti per l’ **azione difensiva** come l'attività battericida e citocida e quindi tumoricida. Come vi dicevo nell'ambito dei meccanismi di difesa contro le cellule tumorali c'è anche l'azione citocida dei fagociti perché vengono reclutati, attivati e scaricano tonnellate di questi derivati tossici dell'ossigeno che possono avere azione tossica.

Però i radicali possono anche avere tutta una serie di azioni diverse da quella difensiva a seconda del momento in cui vengono prodotti, dalla quantità, dall'ambiente, dalla cellula ecc. Posso anche avere quindi **azione pro-infiammatoria**: abbiamo visto le volte scorse a proposito della produzione di vari mediatori, i radicali intervengono per esempio nell'aumento della permeabilità vascolare, aumento dell'adesione dei leucociti all'endotelio, aumento della produzione di fattori chemiotattici, attivazione e secrezione di istamina, attivazione e secrezione di acido arachidonico, attivazione e secrezione delle piastrine, attivazione e secrezione di citochine. Cominciamo anche a conoscere a livello molecolare come funzionano questi radicali liberi dell'ossigeno in queste sue azioni pro-infiammatorie. Uno di questi per anticipare altri concetti è la capacità dei radicali liberi dell'ossigeno di attivare dei fattori di trascrizione -uno di questi è il sistema NF-kB di cui parleremo essendo un fattore di trascrizione fondamentale per i processi infiammatori e non solo. Quindi azione pro-infiammatoria.

Possono anche avere **azione modulatoria** e quindi ci agganciamo alla "resolution face" come mediante l'inattivazione degli enzimi secreti, inattivazione degli inibitori di una proteasi, inattivazione di peptidi chemiotattici. Quindi molecole ossidate possono andare ad inattivare diversi bersagli.

E poi molto importante possono avere **azione tossica** -molto tossica- **a livello cellulare**; quindi una produzione continua, massiva, incontrollata di radicali liberi dell'ossigeno in una reazione infiammatoria acuta soprattutto da parte dei neutrofili attivati -poi ci

sono tanti altri sorgenti dei radicali dell'ossigeno- nella reazione infiammatoria l'inattivazione della NADPH ossidasi gioca un ruolo fondamentale; questo meccanismo può avere azione tossica sia a livello extracellulare che intracellulare come depolimerizzazione del collagene, modificazione strutturale e decomposizione dei proteoglicani, denaturazione delle proteine, perossidazioni, oppure danno cellulare con perdita di funzioni. I radicali possono causare mutazioni e questo è un altro legame tra infiammazione e tumori -il famoso link tra inflammation e cancerogenesi.

E quindi l'azione tossica è quella che vogliamo in realtà combattere, curare ed è quella che è alla base della patogenesi di alcune patologie infiammatorie alcune delle quali sono elencate qui: infiammazioni acute, infezioni croniche, shock tossico. Infiammazioni acute rarissime localizzate nel polmone, in caso di bruciature, di traumi, di danni da riperfusione dopo ischemia (quindi ischemia che provoca infarto, quando si ripristina la circolazione arrivano massivamente i neutrofili che si attivano e rilasciano radicali dell'ossigeno e aggravano la situazione), fibrosi, enfisemi, aterosclerosi. Ci sono patologie acute e croniche, per cui bassi livelli di radicali liberi dell'ossigeno prodotti dai fagociti sono alla base della patogenesi di queste malattie.

Due parole sulle altre isoforme; se vi ricordate vi ho detto che fino a 8/10 anni fa una sola era la NADPH ossidasi di cui si parlava, cioè quella dei fagociti. Poi grazie soprattutto alla biologia molecolare si è capito che ci sono tante isoforme di NADPH ossidasi. Quasi tutte le cellule possono esprimere degli enzimi e la NADPH ossidasi costituita da diverse strutture e diversi componenti.

Tutti questi sistemi enzimatici sono deputati alla produzione di anione superossido. Quindi conosciamo addirittura le NOX1, NOX2 (che sarebbe la NADPH ossidasi dei fagociti), NO-3, NOX-4 e NOX-5 ecc, anche delle “dual oxidase”.Ci sono isoforme dei vari componenti, alcuni dei quali sono gli stessi espressi dai fagociti, la distribuzione e quali possono essere gli stimoli che inducono l'espressione o l'attivazione del sistema -cioè la stimolazione della funzione.

Quindi si sta cercando di capire quali sono le funzioni biologiche di queste varie NADPH ossidasi espresse nei vari tessuti. C'è tutto un settore nuovo e recente che si occupa della NADPH ossidasi nel sistema vascolare e stanno identificando quali sono le cellule che esprimono quali enzimi e quali sono le loro funzioni. I radicali liberi dell'ossigeno possono anche regolare il tono vascolare, le funzioni delle cellule endoteliali e quindi essere implicati nelle patologie collegate. Nel sistema nervoso centrale anche si sono vari NOX; una è la NOX2 che può essere espresse dalle cellule della microglia, che può avere ruolo patogenetico molto importante nelle malattie neuro-degenerative come la malattia di Alzheimer. La malattia di Alzheimer è legata alla formazione di questa proteina -sostanza amiloide- che può attivare le cellule microgliali cioè stimolarle a produrre radicali dell'ossigeno. I radicali hanno azione tossica sui neuroni, per cui alla fine si ha la degenerazione e la demenza senile. Quindi il ruolo patogenetico nelle malattie degenerative del sistema monocitario tra cui l'Alzheimer.

Questa è una figura riassuntiva*(diapositiva mostrata a lezione)* in cui si elencano alcune di queste isoforme, la NOX1 -quali sono le situazioni che possono attivarle. Ancora non è chiaro il quadro ma man mano si stanno definendo l'espressione, la funzione, il ruolo fisiologico e fisiopatologico di queste sostanze.

Derivati tossici dell' azoto

Parliamo velocemente di altri mediatori pro-infiammatori. Per quel che ci riguarda soprattutto in relazione ai meccanismi di difesa insieme ai radicali liberi dell'ossigeno ci sono anche i radicali liberi dell'azoto e i derivati tossici dell'azoto in particolare l'ossido nitrico. L' **NO** è generato dall'enzima ossido nitrico sintasi (nitrossido sintasi) -enzima appartenente alla classe delle ossido-reduttasi che catalizza la reazione dell'arginina in citrullina con formazione di NO.

Esistono tre isoforme della nitrossido sintasi; a noi ci interessa **la nitrossido sintasi inducibile o iNOS** (esiste anche la nNOS, neuronale espressa soprattutto dal cervello e muscoli scheletrici e eNOS endoteliale). Sono tutte molto importanti con ruoli fisiologici in molti ambiti.

eNOS produce NO a bassi livelli soprattutto a livello delle cellule endoteliali e produce effetti protettivi, quindi controllo. Importanti effetti fisiologici di bassi livelli di NO da parte della eNOS -che sarebbe la nitrossido sintasi endoteliale. Quest' ossido nitrico può preservare la struttura della cellula endoteliale, può avere azione vasodilatatoria -di cui abbiamo parlato, partecipa al controllo fisiologico della regolazione del flusso agli organi, può inibire l'interazione endotelio - leucocita sopprimendo l'espressione delle molecole di adesione; quindi un ruolo negativo nell'adesione dei leucociti, un ruolo negativo nell'adesione e aggregazione delle piastrine, previene la fuoriuscita di liquidi a livello della microcircolazione e poi altre azioni come il mantenimento della filtrazione glomerulare, la promozione della rigenerazione dell'endotelio dopo un danno e l'inibizione delle cellule muscolari lisce. Quindi tutta una serie di azioni protettive.

La tipo II – **iNOS-** che è l'enzima che normalmente non è espresso costitutivamente ma dev'essere indotto, infatti si chiama iNOS per "inducible". Infatti dev'essere indotto da stimoli pro-infiammatori; qua è espressa soprattutto da macrofagi ma anche altre cellule come cellule muscolari lisce, miociti e cellule della glia. Anche nella microglia la iNOS può essere espressa e indotta e quindi può produrre ossido nitrico che insieme ai radicali dell'ossigeno può essere tossico per i neuroni. Questo è un altro elemento della patogenesi della demenza, che consiste in una serie di perdite di funzioni neuronali legate la perdita di neuroni per produzione lenta ma continua –cronica- di radicali liberi dell'ossigeno e dell'azoto da parte della microglia attivata -per esempio- dall'amiloide.

Qua vedete*(riferimento ad una diapositiva mostrata a lezione)* un macrofago che può essere indotto ad esprimere l' iNOS. Stimoli classici sono l'IFN-γ da solo, il TNF da solo ma soprattutto la loro combinazione; è una combinazione molto potente che agisce a livello della trascrizione (il macrofago non ha questo enzima, quindi deve trascriverlo) di questo enzima(iNOS). Ci vuole quindi un po' di tempo prima che la cellula produca quest'enzima e produca radicali. Però il rilascio dell'ossido nitrico avviene contemporaneamente all'espressione dell'enzima. Si produce l'enzima e contemporaneamente di produce ossido nitrico. L'IFN- γ e il TNF sinergizzano; da soli attivano l'enzima ma insieme sinergizzano, cioè l'effetto sulla quantità dell'enzima prodotto e quindi anche la quantità di NO rilasciato è molto superiore rispetto alla somma dei singoli effetti. Quindi effetto sinergistico. Quindi la produzione di NO da parte dei macrofagi è meccanismo fondamentale per uccisione dei patogeni intracellulari. Nell''infezione cronico, la cui causa principale è la mancata eliminazione dell'agente patogeno soprattutto nel caso di quelli intracellulari, l'organismo innesca dei sistemi nuovi e più potenti che siano in grado di eliminare questi agenti patogeni intracellulari. Quindi si formano i ROM, i macrofagi si attivano, si montano le unità specifiche soprattutto TH1 che produce IFN- γ e TNF e queste citochine attivano i macrofagi potenziandone l'attività funzionale. Agiscono a molti livelli tra cui l'induzione della iNOS e l'aumento dell'espressione della NADPH ossidasi; quindi l'effetto sarà che questi macrofagi attivati dall'azione di queste citochine prodotte dai linfociti TH1 diventano cellule capaci di produrre tonnellate di sostanze tossiche che adesso diventano capaci di distruggere batteri intracellulari (come micobatteri). Questo meccanismo è fondamentale per l'uccisione di patogeni intracellulari mediante la produzione di radicali dell'azoto, dell'ossigeno e perossinitrito -che abbiamo visto prima. iNOS quindi è stimolato dall' infiammazione, stress cell, tissue injury, hypoxia, prodotti batterici come LPS batterico -che sinergizza con IFN- γ- e citochine. iNOS ha effetti protettivi -cioè utilizzato come meccanismo difensivo o implicato nell'integrità delle mucose dell'intestino- ma se prodotto ad alti livelli può anche avere effetti deleteri come esagerata vasodilatazione con esagerato aumento della permeabilità vascolare, citotossicità e disfunzione delle barriere intestinali. Come sempre queste sostante hanno azione positiva e negativa a seconda della quantità, del contesto in cui lavorano, del momento in cui lavorano.

nNOS (NOS neuronale del cervello) è importante per la plasticità delle sinapsi, quindi è implicata nella memoria e nella regolazione della pressione vascolare e in altre azioni a livello del SNP (e ricordate ha anche azione a livello degli organi genitali).

La **iNOS** importante per l'azione immunitaria difensiva non specifica perché utilizzata da macrofagi e che -se prodotto in grandi quantità- può diventare un composto molto tossico quindi mediazione dell'infiammazione e shock.

E la **eNOS** con vasodilatazione, vasocostrizione, prevenzione dell'aterosclerosi.

Mediatori infiammatori di origine lipidica

Parliamo adesso dei **mediatori infiammatori di origine lipidica**: fosfolipasi A2, ma soprattutto dei derivati dell'acido arachidonico (quindi tutti composti che derivano dal suo metabolismo) e del PAF che deriva dal metabolismo dei fosfolipidi da cui deriva l'acido arachidonico. Alcuni di questi composti sono mostrati in questo schema: prostaglandine, tromboxani, leucotrieni e delle lipossine. In questo schema mancherebbero le prostacicline. Come vedete sono dei composti che derivano dall'acido arachidonico liberato dai fosfolipidi di membrana. Questo acido arachidonico a seconda della cellula e dal corredo enzimatico della cellula e dello stimolo che la attiva a produrre composti X può essere metabolizzato da vie diverse e da enzimi diversi e portare alla produzione di diversi composti. Si parla della via della ciclo-ossigenasi e di via della lipo-ossigenasi -queste sono le due principali vie attraverso cui l'acido arachidonico viene metabolizzato.

Questi composti rientrano nel gruppo dei mediatori chimici, derivano dai fosfolipidi della membrana cellulare per azione di fosfolipasi. Qua vedete, questa molecola ha la struttura di un fosfolipide (glicerolo + acidi grassi) e vedete quali sono i siti di azione di questi enzimi definiti **fosfolipasi.**

Ci sono tante fosfolipasi: **fosfolipasiA1**, che agisce a livello del C in posizione 1 per staccare il gruppo achilico, **la fosfolipasi A2** –quella che interessa a noi in questo momento, **la fosfolipasi C,** che agisce sul C in posizione 3 **la fosfolipasi D**, che invece agisce a questo livello *(cita la diapositiva, NdR)*A noi interessa **la fosfolipasi A1** che agisce a livello del carbonio 2 e che quando funziona stacca l'acido grasso in posizione 2 e rilascia questo composto che si chiama lisofosfolipide -fosfolipide senza l'acido grasso in posizione 2. In posizione 2 ci possono essere vari tipi di acido grasso e quindi cruciale per la formazione e la generazione di questi composti è appunto l'azione della fosfolipasi A2 che libera dove c'è l'acido arachidonico.

Ci sono tantissime **fosfolipasi A2**; ne conosciamo di solubili, quindi extracellulari, che possono essere rilasciate e quindi funzionano a livello extracellulare, e poi delle fosfolipasi intracellulari. Tutte queste fanno tante cose tra cui possono andare ad attaccare i fosfolipidi sia dall'interno che dall'esterno. Ce ne sono tantissime, sono ubiquitarie con varie localizzazioni. Sono molto studiate. Per esempio le fosfolipasi solubili possono attaccare non solo la membrana cellulare ma anche altre strutture che contengono composti lipidici -cellulari o corpi estranei, e quindi possono generare delle vie metaboliche che portano alla produzione di lipidi e queste fosfolipasi possono anche attivare le cellule ad esprimere funzioni di varia natura indipendenti dalla produzione di lipidi. Per esempio, la fosfolipasi solubile può avere varie azioni pro-infiammatorie: può agire su diversi tipi cellulari come astrociti, macrofagi, cellule dendritiche, eosinofili, linfociti T andandole ad attivare perché attiva l'enzima che può attivare queste cellule. A noi interessano le fosfolipasi A2 citoplasmatiche, ma anche quelle solubili sono importanti.

Queste fosfolipasi sono attivati da stimoli pro-infiammatori come batteri, virus, agenti chimici, fisici e tossici che vanno ad attivare queste fosfolipasi e vanno ad agire sui fosfolipidi di membrana e per azione di quest'enzima si libera acido arachidonico da una parte -che poi viene metabolizzato- e si libera fosfolipide senza acido arachidonico che a sua volta diventa lisofosfolipide che può funzionare come sostanza pro-infiammatoria oppure essere metabolizzato a PAF.

Quindi abbiamo una serie di cause (traumi, ustioni, infezioni, che determinano una risposta infiammatoria) che generano mediatori e segnali (lipopolisaccaride, citochine) che vanno ad attivare la fosfolipasi A2 che agisce sui fosfolipidi liberando acido grasso insaturo come l'acido arachidonico che può funzionare da mediatore oppure essere metabolizzato e generare altri composti. Lo stesso vale per il lisofosfolipide che si genera per azione della fosfolipasi A2. Questo composto può funzionare come mediatore, attivare cellule o danneggiarle oppure può essere metabolizzato e trasformato in PAF. Già da questo potete immaginare che i PAF sono molti a seconda del fosfolipide che viene attaccato dalla fosfolipasi A2 (fosfatidilcolina, fosfatidilserina. .).

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 5/12/2012

Sbobinatore: Laura Sponga

Revisore: Alice Falceri

Fisiopatologia, prof. Minuz

05/12/12

La fisiopatologia clinica, a differenza della fisiologia mira a vedere il funzionamento dell'organismo come insieme nell'ambito delle condizioni di malattia.

Questo è importante perché a differenza della patologia generale, dove vengono studiati essenzialmente i meccanismi di malattia, nella fisiopatologia e tanto più nella fisiopatologia clinica vengono analizzati gli aspetti fenotipici, gli aspetti di adattamento funzionale di organi e dell'organismo in generale, alle condizioni di patologia. Quindi è un aspetto, per certi aspetti applicativo, di nozioni che voi avete acquisito nel tempo attraverso il corso di patologia generale e anche attraverso il corso di fisiologia. E quindi si va a vedere un comportamento, un adattamento e vedremo che uno degli aspetti peculiari del comportamento dell'organismo in risposta alle condizioni di malattia è che non sempre (non si capisce realisticamente) questo porta a un miglioramento, cioè non porta necessariamente alla risoluzione della malattia. C'è una condizione come lo scompenso di cuore, che si manifesta attraverso una serie di adattamenti funzionali dell'organismo, che a loro volta generano una progressione dello stato di malattia. Per esempio i soggetti con scompenso cardiaco tengono a trattenere molta acqua, sono edematosi, questo aspetto è un aspetto adattativo, è la conseguenza delle risposte funzionali fisiologiche ad una condizione di alterazione del circolo, che di per sé determina un aggravamento della malattia.

Quindi dovete immaginare che l'adattamento funzionale in fisiopatologia non è svincolato totalmente dal concetto di miglioramento di risoluzione della patologia, è un adattamento dell'organismo che può addirittura essere un fattore di aggravamento in alcuni casi.

Il concetto di omeostasi fa parte dei fondamenti strutturali della fisiologia perché tutto ritorna a una condizione di equilibrio, tutto il sistema tende a riadattarsi per mantenere un equilibrio funzionale, che in condizioni di malattia viene completamente alterato (*registrazione disturbata*) sulla quale è possibile una ragionamento, vedrete finalizzato all'interpretazione del segno clinico, della malattia, all'applicazione diagnostica e terapeutica. Molte delle nozioni di fisiopatologia sono poi finalizzate e hanno trovato applicazione nell'ambito della diagnostica delle malattie, oltre che nell'interpretazione fisiopatologica dei processi e in seguito all'interpretazione molecolare dei processi.

ALTERAZIONI DEL BILANCIO IDRICO ED ELETTROLITICO

CONTENUTO IDRICO DELL'ORGANISMO

L'organismo è costituito in buona parte da acqua.

Se voi prendete il peso corporeo di una persona scoprirete che circa il **60% del peso corporeo di un adulto è costituito da acqua**. Il peso dell'acqua rispetto al peso corporeo totale tende ad essere abbastanza stabile, anzi molto stabile, tende a variare

piuttosto in funzione dell'età: è molto più alto nei primissimi anni, tende a stabilizzarsi nell'età adulta e poi a decrescere nell'età più avanzata, con un rapporto in contenuto idrico leggermente superiore per quanto riguarda l'uomo rispetto alla donna.

La distribuzione è ubiquitaria, però:

- INTRACELLULARE

una quota è **all'interno delle cellule**, rappresenta circa per semplificare i **2/3** del contenuto idrico ed è un'acqua che **è estremamente stabile** perché serve al mantenimento funzionale e vitale delle cellule, quindi variazioni del contenuto idrico intracellulare possono avvenire, e avvengono però in modo molto contenuto e con una tendenza di tipo omeostatico al mantenimento del volume.

-EXTRACELLULARE

il liquido contenuto **al di fuori delle cellule (1/3)** è ripartito a sua volta in diversi compartimenti:

- una quota è contenuta **nell'interstizio,** cioè lo spazio rappresentato da materiale acellulato all'esterno: nell'interstizio dei tessuti, nel tessuto connettivo, negli spazi intercellulari, che rappresenta a sua volta rispetto al terzo circa i **2/3**, quindi gran parte dell'acqua che è al di fuori delle cellule, è contenuta nell'interstizio
- una quota limitata, però fondamentale, è quella contenuta **nel plasma** che costituisce sostanzialmente il soluto (*Ndr credo volesse intendere il solvente*) per le proteine e per i soluti di basso peso molecolare che viaggiano in circolo nel sistema circolatorio. Il plasma anch'esso ha un volume estremamente costante, ed è fondamentale che sia costante perché è il sistema attraverso il quale vengono lette le variazioni di volume, cioè la quantità di sangue nel circolo sanguigno in certe determinate porzioni del circolo sanguigno. È lo strumento tramite il quale i barocettori leggono il riempimento vascolare e di conseguenza uno stato di maggiore o minore idratazione. Quindi è fondamentale che il plasma sia costante, è importante che sia mantenuta una quantità di sangue in circolo adeguata, perché il sangue veicola attraverso i globuli rossi ossigeno ai tessuti e veicola nel plasma le sostanze nutrienti che sono presenti in forma soluta, oppure all'interno di macromolecole come le lipoproteine.
- Infine c'è una quota di acqua che è contenuta nel cosiddetto **terzo spazio**, è uno spazio molto limitato che in condizioni patologiche può espandersi notevolmente. Vedremo in particolare la quantità di acqua che può esser contenuta nella cavità addominale in condizioni come la cirrosi epatica, oppure lo scompenso cardiaco; condizioni nelle quali si attuano meccanismi di ritenzione idrosalina che portano ad un accumulo enorme di acqua che può liberamente accumularsi all'interno della cavità addominale, condizione che si chiama ascite. (**definizione di terzo spazio** : Il terzo spazio sono delle cavità virtuali per lo più, nelle quali può andare a raccogliersi acqua in occasione di alterazioni dell'equilibrio. Il concetto essenziale che identifica il terzo spazio rispetto all'interstizio è che sono cavità nelle quali si può raccogliere del liquido in un modo poco scambiabile, è una sorta di sequestro. Gli scambi tra liquidi avvengono, sennò non avverrebbe l'accumulo, però è mal scambiato, è poco scambiabile quindi è una sorta di sequestro di liquidi.)

Allora visto che l'acqua costituisce il principale costituente dell'organismo, se ne ricava che il mantenimento del contenuto idrico è di vitale importanza. Se voi vi pesate (perché il più semplice e più preciso indice della massa idrica, della quantità di acqua presente nell'organismo, è proprio il peso corporeo) vedrete che il vostro peso è stabile, quindi ci deve essere un meccanismo, che è molto integrato ma non centralizzato (non esiste un unico regolatore dei volumi idrici) che permette di mantenere costante le uscite rispetto alle entrate. Questo in condizioni di fisiologia, perché in condizioni di patologia è proprio lo squilibrio tra entrate e uscite che determina la variazione di volume.

BILANCIO IDRICO QUOTIDIANO

ENTRATE

Quali sono le entrate per l'acqua nell'organismo?

- l’assunzione volontariaquesto già crea una situazione di pericolo perché immaginate nei primi mesi di vita, oppure una persona molto anziana o debilitata, o una persona che non sia in stato di coscienza, non è in grado di assumere acqua, e l’acqua che noi assumiamo attraverso l’alimentazione è l’unica fonte di ingresso in condizioni fisiologiche. Quindi noi siamo affidati per un certo periodo della nostra vita integralmente alla nutrizione che ci viene fornita da altri. Quindi l’organismo di un individuo è in una condizione di pericolo costante per quanto riguarda il bilancio idrico, perché potrebbe non essere in grado volontariamente di assumere acqua oppure di avere un introito adeguato per condizioni esterne. L’ introito idrico può essere molto variabile, c’è una elevata capacità di adattamento nutrizionale in questi termini per quanto riguarda i volumi: noi possiamo ridurli volontariamente, possiamo aumentarli volontariamente, apparentemente anche se voi vi pesate trovate che c’è una notevole stabilità. (oggi ho bevuto di più, ieri di meno, il peso corporeo tende ad essere stabile).
- Ossidazione cellulare solo una piccola quota di acqua è generata all’interno dell’organismo dall’ossidazione cellulare cioè dal metabolismo. Tipico esempio è il metabolismo del glucosio, che porta alla formazione di anidride carbonica e acqua (su basi molari lo stesso quantitativo di una e dell’altra) e fornisce però una piccola quota del fabbisogno idrico dell’organismo, perché sono 10ml ogni 100 calorie, quindi all’incirca sono 200 ml al giorno che si generano in questo modo.

Quindi le entrate sono costituite pressoché unicamente dall’acqua che entra per assunzione volontaria o per somministrazione a cura di altri.

USCITE

Le uscite sono variabili ed è variabile il loro contributo.

In condizioni fisiologiche pesa poco rispetto al totale qualsiasi forma che non sia l’escrezione per via urinaria.

- espirazione C’è una quota fissa che è data dall’espirazione, cioè la quantità di aria che trasferisce all’esterno una quota di acqua in forma aerosolica.
- evaporazione transcutanea la traspirazione cutanea al di là della sudorazione è una quota relativamente stabile, risente di fattori ambientali e può aumentare.
- sudorazione può aumentare molto la quota di acqua che viene persa con la sudorazione, in condizioni di attività fisica intensa e in condizioni ambientali sfavorevoli (molto caldo) i volumi possono aumentare abbondantemente oltre il volume di un litro, e questo ovviamente determina una perdita totale che può essere maggiore di quanto sia in condizioni fisiologiche.
- feci le feci in condizioni fisiologiche contengono un piccolo quantitativo di acqua, però anche qui avete l’immediata nozione che nelle condizioni come la diarrea, in cui si ha un’incapacità di riassorbire oppure c’è un eccesso di secrezione di acqua, si ha una perdita maggiore. In certi casi come certe forme di diarrea generate da infezioni batteriche come quella del colera, tipico esempio di diarrea da mancato riassorbimento, avete delle perdite che possono superare abbondantemente i cinque litri al giorno.
- urine

Quindi abbiamo delle entrate che noi decidiamo, perché avremo delle certe percezioni a livello di coscienza sulla nostra necessità di assumere acqua, e quindi in modo volontario, ma abbiamo perdite che possono diventare incontrollabili. Quella quota che è finemente regolata in condizioni fisiologiche e spesso in condizioni patologiche è quella che viene escreta per via urinaria, cioè è frutto del metabolismo intrarenale dell’acqua e del sodio. Se voi bevete poco il volume urinario tende a ridursi, se voi bevete molto il volume urinario tende ad aumentare, quindi in condizioni fisiologiche il principale organo deputato alla regolazione dei volumi è il rene. La capacità adattativa del rene alle variazioni di volume è estremamente ampia: noi possiamo smaltire le scorie che devono essere eliminate per via renale mantenendo un volume idrico minimo di circa 500 ml uscita attraverso le vie urinarie, e possiamo ugualmente mantenere volumi corporei stabili anche se dovessimo aumentare stabilmente le entrate .Nell’insieme c’è una capacità di modulazione delle risposta funzionale renale estremamente ampia. Questo è un concetto fondamentale, è quello che permette l’adattamento in condizioni di alterazione di altri sistemi. Per esempio se noi siamo in una situazione di grande calore, abbiamo sudato moltissimo perché abbiamo corso, il volume urinario come immaginate possa essere? Invariato o ridotto?

Ridotto. Quindi vuol dire che la funzione renale è in grado di percepire e di adattarsi in risposta a variazioni di volume. Se io ho sudato molto e non ho assunto acqua in modo adeguato l'acqua viene trattenuta attraverso una riduzione dell'escrezione urinaria, attraverso un riadattamento delle filtrazione e del riassorbimento renale.

COMPARTO INTERSTIZIALE

Il comparto interstiziale è in facile equilibrio con il liquido che è contenuto nel circolo arterioso e venoso attraverso il sistema degli scambi a livello capillare, ed è in contatto con le cellule con le quali lo scambio avviene attraverso dei meccanismi altamente regolati. L'interstizio funge da sorta di deposito dell'acqua, in contatto e in equilibrio con scambi continui con sangue e plasma attraverso la rete dei capillari e gli scambi capillari, e dall'altra si affaccia alla cellule con le quali avvengono degli scambi anch'essi strettamente regolati, non per quanto riguarda l'acqua, ma per quanto riguarda i soluti.

COMPARTIMENTO PLASMATICO

Il compartimento plasmatico è vitale, fornisce nutrimento ai tessuti. Il sangue e il plasma stesso hanno una serie di funzioni complesse che vanno preservate. Il volume plasmatico, il volume ematico sono più stabili possibili. Ci deve essere una capacità di percepire le variazioni di volume sanguigno molto precisa, molto attenta e questo è quello che accade, perché se voi avete un'emorragia si instaurano dei meccanismi adattativi cardiovascolari che leggono la perdita di volume ematico anche quando questa è iniziale, quindi vuol dire che il loro sistema, il più efficace sistema di adattamento funzionale dell'organismo alle variazioni di volume, è quello che è regolato dai volumi di sangue circolante.

COMPARTO TRANSCELLULARE (3 SPAZIO)

Il terzo spazio sono quelle raccolte di liquido che sono spesso in cavità definite come virtuali, come il cavo pleurico e la cavità peritoneale, nelle quali però si possono accumulare quantità di liquido. Anche il lume intestinale perché nel lume intestinale c'è secrezione, c'è acqua che arriva per via alimentare e c'è una bassa escrezione quindi ci deve essere un'attiva secrezione e riassorbimento. Il riassorbimento gastroenterico dell'acqua è estremamente efficiente, le perdite idriche rispetto alla quantità di acqua che viene introdotta, rispetto alla quantità di acqua che viene secreta durante il processo di secrezione intestinale è altamente efficiente, per cui le perdite rispetto ad un volume complessivo che può raggiungere quasi dieci litri è un riassorbimento pressoché completo.

COMPARTO INTRACELLULLARE

Nelle cellule evitare che la quantità d'acqua resti più costante possibile perché serve al mantenimento della funzione cellulare. (*Ndr non penso intendesse evitare ma il contrario*) Una perdita di volume idrico nella cellula comporta la morte cellulare. La cellula è una soluzione acquosa in cui sono presenti, al di la degli organelli anche dei soluti di varia composizione, e vedremo che la composizione dei soluti di basso peso molecolare è estremamente selettiva, è quello che permette poi la selettività degli scambi e la preservazione dell'ambiente cellulare.

Per mantenere integro il proprio gradiente idro-salino la cellula consuma circa il 50% della sua attività, del suo consumo energetico. Il 50% del nostro consumo calorico serve al mantenimento di un'efficiente attività delle pompe sodio-potassio a livello di tutte le cellule, quindi a mantenere l'integrità dal punto di vista della composizione idro-salina delle cellule.

MOVIMENTO DEI FLUIDI TRA I COMPARTIMENTI

L’acqua è liberamente diffusibile in quasi tutti i sistemi, nelle cellule entra, quello che è regolato è il trasporto dei soluti. E la regolazione, se noi semplifichiamo a livello di direzione degli scambi, è data essenzialmente dalla **pressione idrostatica** e dalla **pressione osmotica**.

Se c’è un ambiente con un’alta concentrazione di soluti, quindi una forza osmotica maggiore, e questi sono separati da una membrana semipermeabile, l’acqua passerà liberamente verso la zona a concentrazione di soluti più alta, determinando alla fine una condizione di equilibrio. Quindi gli scambi di acqua tra i compartimenti avvengono in funzione della differenza di pressione idrostatica (vedremo nei capillari che questo è il ruolo che svolge il circolo sanguigno) e della differenza di pressione osmotica. In condizioni fisiologiche i differenziali sono minimi in modo che gli scambi siano propriamente controllati. Questo non vuol dire che non ci siano, ma sono mantenuti in un equilibrio dinamico.

OSMOLARITÀ DEI FLUIDI EXTRACELLULARI

Nella cellula voi avete una composizione elettrolitica che vedete è completamente differente da quella che c’è nell’ambiente extracellulare. Abbiamo pochissimo sodio a differenza di quello dell'ambiente extracellulare. Il **sodio** è in concentrazione di circa **140 millimoli** sia nell’interstizio che nel sangue. La stessa concentrazione si ha per il cloro, che forma con il sodio il principale sale di questo ambiente e con il bicarbonato, che forma un sale ancora una volta con il sodio.

Quindi il sodio essendo il principale soluto nell’ambiente extracellulare è quello che determina in buona parte la pressione osmotica dell’ambiente extracellulare.

OMEOSTASI DEL SODIO E DELL’ACQUA NELLA CELLULA

Nell’ambiente intracellulare è il potassio che presenta una elevata concentrazione.

Allora se io ho una concentrazione di soluti caratterizzata da differenze nella composizione, ma un sostanziale equilibrio in termini di concentrazione, io ho che l’ambiente intracellulare e l’ambiente extracellulare vengono mantenuti in equilibrio, e questo equilibrio è generato da una continua attività di estrusione del sodio e di ingresso del potassio. In pratica la cellula si isola dall’ambiente esterno mantenendo una concentrazione di soluti sua propria, a spese di un elevato consumo energetico, e questo permette di mantenere in equilibrio il patrimonio idrico.

Non ci sono squilibri di concentrazione di soluti tra ambiente intracellulare e extracellulare, quindi la cellula non subisce variazioni di flusso idrico in entrata e in uscita.

FORMULE CHE REGOLANO GLI SCAMBI CAPILLARI:

Il passaggio di fluidi in uscita dal capillare nel tratto arteriolare e in entrata nel tratto venulare del capillare avvengono in funzione:

-<u>della differenza di pressione idrostatica</u> che c’è tra interno del lume capillare e interstizio. Tanto più alta è la pressione idrostatica nella fase di inizio, tanto più bassa è la pressione idrostatica nell’interstizio, tanto maggiore è il flusso in uscita.

-della differenza di concentrazione di soluti non scambiabili (**proteine**) che determina una propria forza osmotica che viene chiamata pressione oncotica, che è piccola però è importante perché non è scambiabile.

Se in un capillare tende a decrescere la pressione idrostatica via via che il sangue scorre e resta costante o aumenta la pressione oncotica, io ho che dall'uscita dei liquidi nella fase iniziale del capillare si passa a un rientro dei liquidi nella fase terminale del capillare. Quindi questi sono gli elementi che determinano l'equilibrio di passaggio di acqua e soluti a livello del circolo capillare e in condizioni fisiologiche, è uno scambio che porta all'equilibrio: tanto esce tanto rientra nel capillare.

BILANCIO IDRO-SALINO

L'interstizio comunica con la cellula, la comunicazione per quanto riguarda il passaggio di acqua è libera, i soluti sono mantenuti sequestrati nei due ambienti e quindi è la capacità di mantenere l'equilibrio di concentrazione dei soluti che determina l'equilibrio anche dei volumi.

Se c'è una concentrazione di soluti nella cellula e nell'interstizio che è uguale, indipendentemente dalla composizione dei soluti stessi io ho un equilibrio.

L'equilibrio è fondamentale per il mantenimento della vitalità della cellula e dell'organismo stesso.

Condizioni di disequilibrio osmotico comportano il rischio di morte per l'organismo.

Quindi riassumendo i liquidi extracellulari devono mantenere una solubilizzazione dei soluti in un volume costante, quindi il patrimonio idrico è costante, il patrimonio salino è costante e la concentrazione osmotica nell'interstizio e nel sangue si mantengono in equilibrio e costantemente stabili. La capacità di eliminare acqua e sodio dipende dalle vie di entrata e dalle via di uscita. La capacità di mantenere costanti le perdite di acqua e di sodio determinano un equilibrio, ovviamente in presenza di adeguate entrate. Infine il volume extracellulare è fortemente connesso con il patrimonio salino, la quantità di sodio che abbiamo nell'organismo è tutta nel liquido extracellulare perché nelle cellule ce n'è poco, c'è potassio ,quindi quantità di acqua nell'interstizio e nel sangue vuol dire quale concentrazione uguale quantità di sodio in soluzione, sodio cloruro.

CONTROLLO FISIOLOGICO DEL BILANCIO IDRO-SALINO

-meccanismo della sete

Ci deve essere quindi una percezione costante dello stato di equilibrio. Noi abbiamo una percezione abbastanza continua dello stato del nostro equilibrio idrosalino attraverso il meccanismo della sete. Se noi perdiamo volume idrico (abbiamo corso, abbiamo sudato molto) abbiamo sete. Il meccanismo della sete è un meccanismo che vi permette di avere coscienza della vostra condizione di equilibrio idro-salino, questo è importante perché l'acqua viene assunta in modo volontario, quindi se non ci fosse una percezione della sete l'acqua non verrebbe assunta.

Immaginiamo subito delle condizioni in cui questo può avvenire: il paziente che è traumatizzato, che ha perso coscienza, ha percezione della sete? Se anche ce l'ha è in grado di assumere acqua? Probabilmente no. Quindi il meccanismo della sete è un meccanismo efficiente che si basa sull'integrità dell'organismo, sulla capacità di avere una funzione cerebrale completa, funzione corticale completa, capacità di coordinazione motoria, di assunzione volontaria di liquidi quindi ancora una volta è un meccanismo fondamentale che attiva una risposta, ma richiede un'integrità dell'organismo. Insisto su questi concetti perché la condizione di disidratazione è la condizione che più spesso si determina: un neonato che venga abbandonato per alcune ore va incontro a disidratazione e muore per questo, un anziano che non possa nutrirsi, un paziente che sia stato operato e che non possa essere idratato o che abbia subito un emorragia e non possa essere ripristinato il volume, va incontro a morte.

-barocettori

Ci sono altri meccanismi, alcuni meccanismi attivano delle risposte che vedremo sono fondamentali e che si attivano molto spesso in condizioni di patologia. La percezione di vuoto nel circolo sanguigno viene percepita attraverso alcuni sistemi detti barocettori,

che permettono un adattamento cardiovascolare che fa si che la quantità di sangue circolante possa essere distribuita con maggiore efficienza ai tessuti, non si recupera volume ma si rende più efficiente il circolo.

-metabolismo renale dell'acqua

Infine vedremo come il rene sia fine regolatore a lungo termine del bilancio sia dell'acqua che del sodio, ed è un'azione assolutamente congrua in quasi tutte le condizioni fisiologiche. La capacità di smaltire volumi idrici e salini in modo distinto, però portando entrambi all'equilibrio. Su questo insistono diversi fattori: il sistema renina-angiotensina-aldosterone e la secrezione di vasopressina.

Quindi a livello renale avviene sostanzialmente il mantenimento dell'equilibrio molto fine, è un sistema che non ha una regolazione centrale, il meccanismo della sete è molto sensibile (*registrazione disturbata*) acqua però le uscite sono ugualmente finemente regolate e nelle condizioni di normale funzione renale se voi avete un ingestione di 150 millimoli al giorno, voi avrete un escrezione che è di 150 millimoli al giorno.

MODALITÀ DI CONTROLLO DEL BILANCIO IDRO-SALINO

Se io aumento l'introito salino quello che accade è che una quota di acqua si trasferisce nelle cellule dell'interstizio e riporta l'equilibrio. Se io aumento l'introduzione di acqua io ho una distribuzione di quest'acqua in tutto l'organismo, quindi anche nelle cellule e non ho riequilibrio dei soluti.

La preservazione dei volumi è quello che regola il sistema. E quindi il sodio in condizioni di variazioni di introito idrosalino tenderebbe al disequilibrio.

Quello che accade è una condizione che tende comunque in condizioni fisiologiche ad un debole equilibrio, un esempio può essere questo esperimento.

Immaginiamo che voi siate vegetariani e non assumiate sale per volontà vostra, avete un introito salino pari a zero teoricamente, anche se mangiaste della carne, il sale è solo contenuto nel plasma, nelle cellule non c'è. Quindi voi avete questa dieta vegana e avete pochissimo sale, il vostro peso corporeo è stabile, non siete necessariamente disidratati, il giorno dopo andate a cena e vi offrono un piatto di patatine salate il vostro introito salino passa a 150 millimoli al giorno. La cosa vi è piaciuta e il giorno dopo andate avanti con 150 millimoli, oppure potete farlo come esperimento e decidete voi quanto sodio introdurre. Cosa accade? Il sodio urinario era in equilibrio con le entrate e entro tre giorni si riporta in equilibrio con le entrate, cioè la quota di sodio che esce nelle urine raggiunge dopo tre giorni il pareggio con le entrate. Questo vuol dire che il sistema di adattamento funzionale principalmente legato ai meccanismi di regolazione del metabolismo del sodio a livello renale è molto efficiente. In questa fase intermedia ci sarà una quota di sodio che viene trattenuta; se viene trattenuto del sodio viene trattenuta anche dell'acqua quindi il vostro peso corporeo sarà aumentato. Quando raggiungete l'equilibrio il vostro peso corporeo non aumenta più. Il peso resta stabile e si riporta nel tempo ai valori iniziali. Se voi smettete di assumere il sale e dopo una settimana tornate alla vostra dieta originaria che cosa accade? Le entrate sono ridotte ed entro tre giorni le uscite si riducono quindi avrete una fase in cui voi perdete più sodio di quanto non ne entra, perderete più acqua rispetto all'equilibrio e quindi perdete quel chilo in più che era comparso. Questo concetto è fondamentale perché aiuta a spiegare alcuni dei meccanismi che portano anche all'eccesso di ritenzione salina in alcune condizioni, e perché si possono avere delle consensuali variazioni della pressione arteriosa.

Se io ho un incapacità del rene di eliminare il sodio del tutto, cosa mi immagino? Che l'equilibrio non venga mai raggiunto e quindi teoricamente il peso corporeo tende ad incrementare. Se io non riesco a eliminare tutto il sodio come vorrei in teoria dovrebbe aumentare il peso corporeo in proporzione, perché tanto sodio io introduco tanta acqua viene trattenuta per cui il concetto è la conservazione del volume e dell'osmolarità.

Vedremo che questo non accade e per cui in queste condizioni comincerà a salire la pressione.

Quindi secondo concetto (*registrazione disturbata*) c'è una relazione continua tra entrate di sodio e uscite di sodio, è una relazione (*registrazione disturbata*).

Però in teoria c’è una capacità che è illimitata di smaltire enormi quantità di acqua e di sodio, però con variazioni consensuali dei volumi. Se si dovesse arrivare ad assumere 1200 non è possibile, avrei un incremento teorico di 8 litri di liquido interstiziale, che si mette in equilibrio con il liquido intracellulare, quindi vuol dire (8+4) 12 litri; in realtà sono condizioni che non si realizzano in condizioni fisiologiche non siamo in questa fase qui (*figura*). Quindi per dare qualche numero, se io aumento di 150 millimoli al giorno l’assunzione di sale (assumo sale come tale e non acqua consensualmente) io ho un passaggio di acqua per portare l’equilibrio osmotico tra le cellule dell’interstizio, che farà passare un litro di acqua dall’interno all’esterno. Avrò sete per cui introdurrò fino a un guadagno netto di un litro, l’osmolarità sarà aumentata, finché non si raggiunge l’equilibrio l’osmolarità tende a salire. Quando si raggiunge l’equilibrio l’osmolarità tende al normale, se voi bevete, perché avete sete, un litro d’acqua compensate questo shift dall’interno delle cellule all’interstizio, per osmolarità vi torna normale

Se io perdo acqua correndo con il sudore (perdo anche del sale, ma ne perdo meno di quanto abbia perso acqua) tendenzialmente cosa avrò: una perdita di volume, che sarà a carico di tutti i compartimenti perché l’acqua è liberamente mobile, una quota di sale piccola in meno, l’osmolalità dell’interstizio tende a salire, acqua esce dalla cellule per entrare nell’interstizio.

Se io bevo ripristino i volumi, recupero peso corporeo e ritorna verso il normale l’osmolarità.

Quindi l’osmolarità cambia in condizioni fisiologiche nei momenti di passaggio, tendenzialmente tende a essere molto stabile, i volumi tendono a essere recuperati.

Se io bevo molta acqua senza sale, per esempio molta birra che non contiene sale, cosa accade?

In una fase iniziale tendo ad avere un espansione dei volumi e una riduzione dell’osmolarità, perché i volumi si distribuiranno in tutti i compartimenti, ma il sale è presente solo nell’interstizio e nel sangue quindi la quota di acqua che resta nell’interstizio e nel sangue diluirà il sodio.

Piccola nozione: se voi bevete molta birra, avete una depressione del sistema della vasopressina, avete volumi espansi, avete una diuresi molto abbondante, avendo una diuresi molto abbondante perdete sodio, se non mangiate qualcosa di molto salato andate in iposodiemia. È tipico dei bevitori di birra: possono avere un peggioramento neurologico non solo per l’alcol ma anche per una iposodiemia secondaria.

(registrazione disturbata)

Queste variazioni fisiologiche durano poco perché ci sono dei sistemi che riportano all’equilibrio primo fra tutti la sete.

Quindi i volumi extracellulari che regolano l’escrezione di acqua e di sodio sono i volumi che vengono percepiti, quelli che portano alla risposta della sete e dell’adattamento cardiovascolare, sono quelli che sono percepiti a livello del circolo arterioso prossimale, a livello dell’encefalo e soprattutto il sistema di percezione basato sui barocettori percepisce quello che si chiama il riempimento vascolare che determina quello che si chiama il **volume ematico efficace**, cioè la quantità di sangue che è giusta per il funzionamento circolatorio. È un concetto un po’ astratto però nella pratica è la quantità di sangue che distende adeguatamente le grosse arterie e quindi è la quantità di tensione di parete che determina uno stiramento dei barocettori tale da dare un segnale adeguato al sistema nervoso centrale, che adatti la funzione cardiovascolare, che regoli la secrezione di vasopressina.

Vedremo che in alcune condizioni come lo scompenso cardiaco e l’emorragia si ha una stimolazione massiva della risposta adattativa basata sul riempimento arterioso, mentre voi se vi immergete in acqua avete una compressione dello sterno e un riempimento circolatorio centrale maggiore quindi il sistema tende a percepire fin troppo pieno.

TONICITÀ DEI FLUIDI E OMEOSTASI DELL’ACQUA INTRACELLULARE

Quindi le variazioni di volume e le variazioni di sodio sono percepite e sono parzialmente distrutte però tendono a riportare il sistema all’equilibrio. Il patrimonio idrosalino si muove tendenzialmente in modo consensuale. E questo deve avvenire perché ci deve essere sempre quello che abbiamo visto, l’equilibrio tra concentrazione di soluti nei diversi compartimenti.

<u>Isotonico</u>

Ci sono delle funzioni fisiologiche: la quantità di potassio e di altri soluti anche di peso molecolare elevato che sono presenti all'interno della cellula sono in perfetto equilibrio con la concentrazione di cloruro di sodio e di altri soluti che sono presenti nell'interstizio e nel sangue. L'ambiente è del tutto isotonico quindi, non ci sono squilibri di pressione osmotica tra cellula e interstizio.

Ipotonico

Però se dovesse diminuire la concentrazione di soluti all'esterno ad esempio voi avete corso molto, avete sudato molto, avete perso molta acqua, avete perso un po' di sodio, non tanto come concentrazione ma in assoluto ne avete perso parecchio, perché se avete perso 3, 4 litri avete perso il sodio che è contenuto in un litro e mezzo due ,quindi se vuoi bevete dopo l'equivalente di 4 litri cosa avete? Avete perso una quota del sodio che è andato via con il sudore e non l'avete più ripristinato, perché avete bevuto solo acqua non acqua e sale. E cosa accade? Si genera una condiziona di ipotonia all'esterno perché c'è una relativa diluizione poiché la quantità di sodio dell'organismo si è ridotta. Avete ripristinato i volumi ma non avete ripristinato la concentrazione del sodio, si crea un ambiente ipotonico. Che cosa determinerà questo? Un passaggio di acqua all'interno della cellula, la **cellula si rigonfia**.

Considerate che questa condizione è tutt'altro che rara, è una tipica condizione che si verifica negli anziani che hanno poca capacità di percepire il senso della sete, che dipende molto dalla concentrazione del sodio, per cui bevono spesso in modo inadeguato e spesso son trattati con dei farmaci come i diuretici che fanno perdere sodio. Sono soggetti in cui il patrimonio salino tende a ridursi, mantengono magari una dieta inadeguata e hanno anche un'alterata percezione del senso della sete ,quindi bevono in modo irregolare o eccessivo o improprio.

Risultato può generare una grave ipotonia cioè l'ambiente extracellulare è fortemente deficitario di sodio. Ricordate che è un deficit relativo non è una tendenza assoluta, già quando la concentrazione di **sodio cloruro** scende da 140 a 120 avete una condizione di rischio per la vita, la concentrazione del sodio, che è il principale determinante dell'osmolarità, **ridotto del 15% determina già una concentrazione di rischio per la sopravvivenza**. E perché c'è il rischio? Perché le cellule si rigonfiano, le cellule neuronali possono essere danneggiate in modo irreversibile e si può avere una morte, un coma di tipo da iposmolarità, da rigonfiamento cellulare. Quindi l'osmolarità è vitale che sia mantenuta costante, in perfetto equilibrio tra ambiente intracellulare e extracellulare.

Ipertonico

Ci sono delle altre condizioni in cui l'osmolarità dell'ambiente extracellulare può salire moltissimo. Sicuramente avrete sentito parlare di **diabete mellito**: è una condizione per cui si genera nei tessuti (*registrazione disturbata*) è troppo poca rispetto alla necessità per cui l'entrata del glucosio nelle cellule è fortemente ridotta. Nel frattempo si genera anche molto glucosio, la concentrazione dei soluti presente all'esterno delle cellule è molto alta. Non è sodio in questo caso ma è una sostanza osmoticamente attiva perché il glucosio è osmoticamente attivo. Il glucosio fra l'altro non eccita un senso di sete, che vedremo avviene quando aumenta la concentrazione di soluti, e allo stesso tempo per mancanza di insulina non entra nelle cellule, quindi si crea una discrepanza tra concentrazione osmotica all'esterno delle cellule e all'interno delle cellule, per cui si genera un passaggio netto di acqua dalle cellule all'interstizio, dall'interstizio al sangue. Risultato le **cellule raggrinziscono** (fenomeno dello **shrinking** in inglese), è un fenomeno dannoso per la cellula che porta ugualmente a danno cellulare e potenzialmente a morte dell'individuo.

Si genera quella condizione che è il coma diabetico, il paziente non è in grado di rispondere agli stimoli, ha la perdita delle capacità cognitive, ha un grave deficit di funzionalità dell'organismo perché il sistema nervoso centrale è fortemente danneggiato dalle conseguenze dello squilibrio osmotico che si è generato.

Quindi il concetto è che ci deve essere sempre un equilibrio osmotico tra ambiente intracellulare, interstizio e ambiente intravascolare e che questo è mantenuto attraverso una regolazione per certi aspetti indipendente del patrimonio salino che va mantenuto costante, perché deve consensualmente adattarsi (*registrazione disturbata*)

ALTRI COMPOSTI AD ATTIVITÀ OSMOTICA

Nell’ambiente extracellulare abbiamo visto che il **sodio** è il principale composto osmoticamente attivo però ci sono altre sostanze come il glucosio (esempio fatto prima del diabete) e l’azoto ureico.

Il glucosio che è presente in una concentrazione di circa **80 milligrammi per decilitro** ha una propria attività.

Questa è una formuletta per uso pratico che mi permette di calcolare l’osmolarità sui dati di laboratorio biochimico:

Se io ho 80 milligrammi per decilitro che è la concentrazione fisiologica del glucosio per sapere quante millimoli di glucosio ci sono divido per il peso molecolare del glucosio che è 180 (siccome sono milligrammi per decilitro divido per 18). Risultato circa 4,5 millimoli di glucosio per litro di sangue.

Anche **l’azoto ureico,** che è il prodotto del metabolismo epatico dell’ammoniaca.

C’è una certa concentrazione di azoto ureico in circolo, il peso dell’urea è 28, questa è circa **20 mg/dL** e il peso in millimoli è poco meno di 5.

Quindi per calcolare l’osmolarità del sangue:

2x [Na+ (mEq/L)] + glucosio(mg/dL)/18 +azoto ureico (mg/dL)/2,8 = **275-295 mOsm/Kg**

Calcoli approssimativi (140 x 2) + 5+5 = 280+10 = 290

Ho 140x2 siccome il sodio è in equilibrio con un anione, perché l’anione è osmoticamente attivo. Nei sali dovete considerare la forza osmotica come la somma dei due componenti del sale anione e catione.

275-295 mOsm/Kg è l’osmolarità normalmente nel sangue con una valore mediano di solito di poco superiore ai 280.

<u>Esempi</u>

Quindi questa è la composizione in termini di forza osmotica dei principali soluti del liquido interstiziale e del plasma. Ne deriva che se dovesse variare verso l’alto, però non è facile, o verso il basso la concentrazione del sodio, io ho un abbassamento dell’osmolarità.

<u>Diabete :</u>

Ma questa può variare anche se incrementa improvvisamente il valore della glicemia. Se voi avete un diabete non compensato la glicemia può arrivare a valori di **600-800 mg/dL**. Se ho 800, anziché avere 4,5 millimoli di glucosio ho 45 millimoli di glucosio, quindi l’**osmolarità sale di 40 quindi da 285 vado a 225**, che è un valore estremamente elevato. Se poi tengo presente che il sodio è il solo determinante di una risposta degli osmocettori e quindi della risposta della sete e del rilascio di vasopressina, vedo che nel diabete si creano delle condizioni estremamente drammatiche perché ho un aumento dell’osmolarità, che o correggo dando insulina rapidamente e acqua, o sennò porta a morte.

<u>Insufficienza renale:</u>

Stessa cosa può accadere ma in misura minore nell'insufficienza renale, perché oltre all'azoto ureico anche altri soluti potrebbero accumularsi e quindi determinare un aumento dell'osmolarità.

ALTERAZIONI DELLA REGOLAZIONE DEI VOLUMI

Vediamo quindi alcuni aspetti di tipo quantitativo per quanto riguarda gli squilibri di volume.

1. DISIDRATAZIONE

Una perdita di volume idrico viene suddivisa in base all'entità della perdita stessa in 3 livelli

Disidratazione:

- lieve: quando il **peso corporeo** (che è l'indice più semplice per calcolare il volume idrico perché pesa la massa di acqua) **scende fino al 2%**. Quindi vuol dire che ho perso il 3,4% della quantità di acqua. Non avviene praticamente nulla in termini di risposta funzionale. L'organismo può tollerare questo, é quello che accade probabilmente tra un pasto e l'altro ed è di poca rilevanza.

- moderata: fino a **-5% del peso corporeo,** quindi fra l'8-10% del volume idrico, comincia a dare delle risposte di tipo adattativo, comincia a avere la percezione di una variazione della quantità di acqua che è presente nell'organismo. L'organismo comincia a reagire attraverso un sistema integrato di risposte.

-grave: se la perdita di volume è **superiore all'8% del peso corporeo** quindi superiore del 10% del volume idrico complessivo, la perdita di volume diventa grave e si instaurano in tempi molto rapidi dei sistemi di adattamento che tendono a ripristinare il volume, o perlomeno tendono a mantenere adeguata la funzione circolatoria.

Tenete presente che se io ho una disidratazione, ma l'acqua è trattenuta **nel terzo spazio,** il peso corporeo non mi da una lettura di questo fenomeno. Se voi avete una diarrea e nel lume intestinale è contenuto un enorme volume di acqua prima che venga eliminata, io ho una **non variazione del peso corporeo**, ma ho un sequestro di acqua in un ambiente che non comunica né con l'ambiente circolatorio né con le cellule. I pazienti che hanno la diarrea stanno male prima ancora della prima scarica, perché stanno accumulando acqua nell'intestino. Quest'acqua è sequestrata nel terzo spazio, il peso corporeo non è calato perché l'acqua non è stata eliminata, però il soggetto sta già male. Ha gli stessi sintomi della disidratazione che ha dopo la scarica, perché l'acqua è già comunque stata sequestrata nel lume intestinale.

Infine tenete presente che se io ho una variazione di volume la prima cosa di cui devo preoccuparmi è sapere qual è la **concentrazione del sodio**. Perché se io perdo acqua con la diarrea il secreto intestinale contiene sodio nella stessa concentrazione del plasma, quindi non noto differenze nell'osmolarità. Ma se io perdo molto sudando avrò la tendenza ad avere una concentrazione del sodio che tende a salire, perdo più acqua che sodio. Se invece uso un diuretico che mi fa eliminare più sodio che non acqua, tendo ad avere una disidratazione di tipo ipotonico, perché tendo a perdere acqua si, ma molto più sodio. Quindi devo sempre considerare il concetto che si sta creando una condizione di disequilibrio, per cui la variazione di acqua potrebbe non essere consensuale a quella del sodio. E quindi l'informazione data dal peso corporeo può essere fallace nel caso ci sia un sequestro di acqua , però l'informazione relativa all'osmolarità complessiva all'ambiente extracellulare la ottengo solo attraverso la misurazione dei soluti, perché l'aumento dei soluti non è prevedibile se non in modo impreciso e comunque non è predetto assolutamente dal peso corporeo.

Concetto: il volume può variare ma il sodio e gli altri soluti potrebbero variare in modo dissociato, dipende da come si è generata la disidratazione.

DEPLEZIONI DI VOLUME CIRCOLANTE

CON VOLUME EXTRACELLULARE DIMINUITO:

<u>perdite extrarenali di sodio e acqua</u>

In realtà io posso avere deplezioni di acqua che sono abbastanza sincrone con quelle del sodio.

-nelle *perdite gastrointestinali*, il succo enterico ha una concentrazione salina

che è la stessa dell'interstizio,quindi se io perdo con la diarrea acqua e sodio io ho una deplezione di volume ma non noto particolari squilibri della concentrazione osmotica.

-nelle *lesioni cutanee*,condizioni in cui si ha perdita di acqua dell'interstizio contenente sodio.

-nelle *emorragie* , determinano una brusca variazione del contenuto di acqua e di soluti nell'organismo, però quantitativamente poco rilevante ma è qualitativamente molto rilevante. Se voi perdete un litro di sangue avete perso 1 kg, rispetto al patrimonio idrico complessivo avete una lieve perdita di volume, però è tutto a scapito del compartimento che è importante, cioè quello che trasporta il nutrimento e l'ossigeno ai tessuti. Quindi l'organismo nell'evoluzione ha attuato una serie di meccanismi che leggono con grande sensibilità le perdite di volume. Se noi abbiamo un sanguinamento anche che non sia visibile abbiamo una percezione da parte di tutti i sistemi (sete, secrezione di vasopressina, tachicardia, riflessi vasomotori, meccanismi renali). Perché il sangue è prezioso, e quindi se si perde il sangue l'organismo legge immediatamente questo.

Potete avere un'emorragia mascherata (un'emorragia digestiva o un'emorragia nella cavità peritoneale) e questa potrebbe non essere percepita fisicamente, però il soggetto che ha questa, ha una serie di sintomi e manifestazioni (come avevamo detto per il soggetto con la diarrea ma in modo molto più accentuato) che sono espressioni della mancanza di volume nel circolo.

Se guardo il peso corporeo non ho grandi informazioni, se io guardo la concentrazione di sodio non ho grandi informazioni, devo avere una qualche misura della quantità di sangue in circolo. Voi sapete come posso misurare il sangue in circolo? (L'ematocrito? sì, se perdo sangue perdo anche il globuli ma subito non è sensibile, dopo diventa sensibile). È la **pressione**.(*registrazione disturbata*)

<u>Perdite renali di sodio e acqua</u>

Se io perdo acqua e sodio per via renale è possibile che si crei una qualche dissociazione tra perdita di acqua e perdite di sodio.

-ad esempio nel *diabete* è molto il glucosio in circolo, il glucosio filtrato non viene riassorbito integralmente dal tubulo prossimale, (sopra una certa concentrazione il glucosio passa nelle urine) e siccome è una sostanza osmoticamente attiva porta con se acqua e quindi si genera una diuresi in cui c'è molta perdita di acqua e in certa misura una minore perdita di sodio.

-Se *manca aldosterone* (l'aldosterone è un ormone che regola l'assorbimento distale nel tubulo collettore del sodio) il riassorbimento viene perso e si ha sodio nelle urine, si perde anche acqua ma la quantità di sodio che viene persa è molto elevata. E quindi ho una disidratazione in cui la concentrazione di sodio nel sangue tende a decrescere.

<u>Perdite renali di acqua</u>

-Oppure posso avere una condizione nella quale il tubulo renale non è in grado di riassorbire l'acqua, perché se manca il recettore per la vasopressina a livello del tubulo distale, non si aprono i canali dell'acqua, l'acqua non viene riassorbita, perdo acqua con le urine. Perdo molta più acqua di quanto non perda il sodio, perché è nel tratto distale del tubulo, quindi il sodio che si perde è poco. Ho una disidratazione e la concentrazione di sodio nel sangue tende a salire molto, è quello che accade nel cosiddetto **diabete insipido** sia centrale che nefrogenico. Dove manca la vasopressina oppure manca il recettore per la vasopressina nel tubulo.

Quindi io posso avere uno stato di disidratazione in cui la quantità di acqua e di sodio può essere sincrona o dissociata.

CON VOLUME EXTRACELLULARE UGUALE O AUMENTATO

Paradossalmente vengono lette come perdite di volume, anche delle condizioni in cui il riempimento circolatorio è inadeguato, ma la quantità di acqua nell'organismo può essere anche aumentata.

Sono alcune condizioni:

ad esempio in un deficit di *albumina*, o in *condizioni di infiammazione sistemica*, oppure dove ci sia stato un *sequestro nel terzo spazio*, oppure quando ci sia una *riduzione della capacità del cuore* (scompenso cardiaco) di spingere in avanti il sangue in cui il sistema barorecettoriale rileva che il riempimento si riduce, però la perdita di volume complessiva non è reale (il volume è addirittura aumentato), è semplicemente mal distribuito tra i compartimenti. Principalmente tra i compartimenti interstiziale e terzo spazio da una parte, e compartimento ematico dall'altra.

Sono le condizioni in cui entra il concetto di **perdita di volume efficace**, il volume ematico efficace viene perso, non è correttamente distribuito.

ESEMPI DI ALTERAZIONI CHE CONDUCONO A DEFICIT DI VOLUME

Introito inadeguato

- incapacità di assumere acqua

- perdita del senso della sete

- inadeguata somministrazione di liquidi (in soggetto non autosufficiente)

Espansione del terzo spazio

Eccessiva perdita

- eccessiva perdita renale

- eccessiva perdita transcutanea (sudorazione)

- emorragia

MANIFESTAZIONI CLINICHE

- Perdita di peso
- Cute meno elastica per perdita di acqua nell'interstizio
- il volume delle urine tende a ridursi
- urine con elevata osmolarità: l'acqua viene trattenuta il più possibile, e contengono pochissimo sodio
- nel sangue le componenti cellulari, a meno che non ci sia un'emorragia, tendono ad aumentare, perché c'è perdita del plasma e non di cellule
- i soluti tendono a incrementare la loro concentrazione

- minore riempimento arterioso e quindi più bassi valori di pressione (si accompagna ad un adattamento funzionale cardiaco e quindi il cuore batte più in fretta ,e si ha la tachicardia)
- le vene tendono a essere più piene
- nei casi gravi si arriva a una condizione di completa inadeguatezza del circolo (es in emorragia grave non corretta, in una disidratazione molto grave, in una diarrea profusa, perdita di acqua con deficit di vasopressina) si può avere uno shock. Lo shock è una totale incapacità di fornire un circolo adeguato
- essendoci una relativa (registrazione disturbata) dell'osmolarità, tende a incrementare anche la temperatura corporea

La condizione di disidratazione dovete tenerla sempre presente perché si instaura molto facilmente e complica moltissime condizioni. Quando inizierete un'attività di tipo clinico vi chiederanno di rilevare i cosiddetti parametri vitali, che sono dei segni di un'adeguatezza del circolo. Molti dei parametri vitali possono essere compromessi (frequenza cardiaca, pressione arteriosa) da una condizione di disidratazione. Disidratazione è una specie di spettro che complica, condiziona o causa molti stati di patologia, perché si instaura molto facilmente. (in neonatologia, anziani, chirurgia)

2.IPERIDRATAZIONE

La condizione di iperidratazione (*registrazione disturbata*)

Se io ho una iperidratazione devo avere un'incapacità di regolare i volumi, però se si verifica è una condizione spesso di difficile controllo.

ALTERAZIONI CHE CONDUCONO A ECCESSO DI VOLUME

Incapacità di eliminare sodio e acqua

In condizioni fisiologiche se io bevo di più o prendo più sale, dopo un po' si crea un equilibrio quindi aumenta l'escrezione del sale o dell'acqua. Quindi la prima ipotesi è che se io non riesco a eliminare l'acqua e il sale, posso andare in contro ad uno stato di iperidratazione.

-*insufficienza renale* (in realtà quella che meno facilmente da un incremento dei volumi di acqua e di sodio)

-*insufficienza cardiaca* si ha una grave ritenzione di acqua e di sodio, si forma l'edema

- *scompenso cardiaco*

- *scompenso epatico*

- *iperaldosteronismo* se io ho eccesso di aldosterone ho iperidratazione, ma relativa per la pressione

- *ipercortisolismo*

Insufficienza cardiaca, scompenso cardiaco ed epatico sono le condizioni che più si accompagna ad un enorme ritenzione idro-salina però paradossalmente si accompagnano anche ad un basso riempimento arterioso.

Ci sono altre condizioni come l’insufficienza renale in cui c’è un perenne disequilibrio, quindi una tendenza all’incremento dei volumi, però non è mai un incremento massivo perché questo è compensato da un incremento di pressione.

Eccesso di introito

È più difficile che io riesca a ottenere un eccesso di volume assumendo acqua e sodio, certamente ho una maggiore idratazione e in una certa misura il peso corporeo può salire, ma in modo limitato se la funzione renale è conservata. Più facile che si abbia una condizione di squilibrio in un soggetto che non è in grado di assumere acqua e sale e in modo improprio per via endovenosa. Questo può creare una condizione di entrate maggiori.

Quindi il più delle volte il meccanismo di base è una relativa discrepanza tra entrate e uscite, ovviamente con maggiori entrate che uscite.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 10/12/2012

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia del 10/12/2012

Sbobinatore: Michele Tosi

Revisore: Simone Ferraro

Nella lezione precedente stavamo parlando dei mediatori lipidici.

In caso di flogosi si generano dei segnali che vanno a stimolare la **fosfolipasi A2** (PLA2), la quale poi agisce sui **fosfolipidi di membrana**. Essa è in grado di attaccare il carbonio in posizione 2, dove in genere è attaccato un acido grasso polinsaturo che può quindi essere staccato e può funzionare come mediatore lipidico (andando per esempio ad attivare le cellule direttamente oppure, soprattutto se si tratta di acido arachidonico, viene catabolizzato e produce una serie di altri mediatori).

Quello che rimane dall'azione della fosfolipasi è il **lisofosfolipide**, che a sua volta funziona da mediatore direttamente oppure viene metabolizzato e quindi dà origine ai PAF (*Platelet Activating Factor*).

L'**acido arachidonico** può essere metabolizzato tramite due vie principali:

Via della ciclossigenasi (COX)

Da questa via si generano una serie di sostanze che hanno una attività biologica molto variegata, che sono le **prostaglandine** (PGD2, PGE2, PGF2), le **prostacline** (PGI2) e il **trombossano** (TXA2).

Questi composti possono essere prodotti da tutte le cellule, più o meno. La loro produzione dipende dal corredo enzimatico che ciascuna cellula esprime e che quindi fa sì che quella determinata cellula produca quel o quei determinati prostanoidi/eicosanodi.

- le PGD2 sono prodotte per la maggior parte dai mastociti e dalle cellule renali;

- le PGE2 sono prodotte da tanti tessuti, compresi i leucociti;

- la PGF2A è sintetizzata principalmente dalle cellule muscolari lisce e dalle cellule muscolari dell'utero;

Tutti questi eicosanoidi lavorano legandosi a dei **recettori** specifici, che sono dei recettori che appartengono alla categoria dei recettori che legano le proteine G.

A seconda del recettore possono esercitare funzioni differenti come l'infiammazione, la regolazione del sonno (PGD2), la regolazione delle risposte biologiche/infiammatorie, il potenziamento delle risposte al dolore, la vasodilatazione, la broncostrizione, l'attività trofica/citoprotettiva, la secrezione acida delle cellule della mucosa gastrica, la produzione di muco, il flusso di sangue. La PGE2 è inoltre un mediatore centrale nel processo della **febbre**: è infatti legato alla produzione di **citochine** proinfiammatorie come IL-1 e IL-6, prodotte dal fegato e altre cellule.

Più recentemente sì è scoperto che possono anche essere coinvolte nell'ambito dell'immunità innata e specifica.

- per esempio, PGE2 e PGI2 sono coinvolte nel reclutamento delle cellule immunitarie attraverso recettori diversi espressi da cellule diverse (cellule endoteliali, cellule della mucosa gastrica, etc). Possono quindi indurre la produzione di alcune **chemochine**, come per esempio l'MCP1/CCL2, CXCL12/SDF-1 e CXCL7.

- inoltre possono andare a collaborare con altri stimoli molto potenti come l'LPS per la produzione di citochine da parte dei macrofagi, l'IL-1 nel caso dei fibroblasti, con l'IL-12 per la polarizzazione verso i T_H1 o con vari stimoli che agiscono sulle cellule dendritiche (TLR, CD40) per la polarizzazione dei T_H17.

- la PGE2 prodotta dalle cellule tumorali può avere un ruolo immunosoppressorio e inibire direttamente i CTL e le cellule NK oppure favorire lo sviluppo delle **MDSC** (*Mieloid Derived Suppressor Cells*), che sono cellule di origine mieloide che in pazienti portatori di tumori vengono prodotte in grande quantità dal midollo spinale a causa di sostanze rilasciate dalle cellule tumorali e favoriscono l'*escape* del tumore inibendo soprattutto lo sviluppo dei linfociti T.

Sempre recentemente si è osservato che le prostaglandine possono avere un ruolo nel *tissue remodeling*, cioè la fase riparativa dell'infiammazione. Agendo su diverse cellule bersaglio possono favorire la produzione di collagene, indurre la produzione di VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e quindi favorire l'angiogenesi direttamente o indirettamente richiamando le cellule endoteliali che saranno stimolate dal VEGF.

I trombossani sono rilasciati dalle piastrine, mentre le prostacicline sono prodotte dalle cellule endoteliali. Questi due composti hanno un'azione opposta.

I **trombossani** hanno azione di tipo vasocostrittrice, favoriscono l'aggregazione delle piastrine e attivano i PMN (polimorfonucleati). Hanno infatti la capacità di attivare la guanilil ciclasi che produce il cGMP, che aumenta la risposta biologica.

Le **prostacicline** hanno azione vasodilatatrice, antiaggregante e inibitoria dei PMN. Hanno infatti la capacità di attivare l'adenilato ciclasi che produce il cAMP, il quale inibisce la risposta biologica.

[NdR: *viene illustrata brevemente una tabella riassuntiva delle funzioni dei metaboliti dell'acido arachidonico fin qui elencati*]

Via della 5-lipossigenasi

Questa via attiva la formazione dei **leucotrieni**.

LTB4 è uno dei più potenti attivatori della chemiotassi dei neutrofili e dei monociti

LTC4, LTD4, LTE4 sono derivati da LTB4 e vengono rilasciati soprattutto dai mastociti durante le reazioni allergiche (causano vasocostrizione, broncocostrizione e aumento della permeabilità vascolare); inoltre LTD4 è chemiotattico per le cellule fagocitarie, favorisce la loro adesione ed extravasazione e aumenta la permeabilità a livello del microcircolo.

Ad oggi si conoscono sostanzialmente 2 **recettori,** che possono omopolimerizzare o eteropolimezzare fra di loro:

CysLT1

CysLT2

Si pensa che ne esistano anche altri perché in esperimenti con topi knock out per questi recettori le risposte ai leucotrieni si manifestano lo stesso.

[*NdR: viene illustrata brevemente una tabella riassuntiva passaggi dell'infiammazione acuta in cui sono coinvolti questi mediatori lipidici*]

Gli eicosanoidi fin qui elencati sono collegati a varie patologie:

asma

malattie infiammatorie croniche

artrite

glomerulonefrite

Alzheimer

cancro

aterosclerosi

malattie della pelle

malattie dentali

[*NdR: viene rapidamente illustrata una diapositiva che da una parte illustra le classiche vie metaboliche dell'acido arachidonico attivato dalla fosfolipasi A2, dall'altra mostra che esistono altre vie metaboliche su cui il professore non si sofferma. Per esempio la lipossigenasi può produrre gli HETE (acido idrossieicosatetraenoico) e anche il citocromo P450 può metabolizzare l'acido arachidonico e generare una serie di composti*]

Quando i recettori degli eicosanoidi vengono sintetizzati all'interno della cellula devono essere rilasciati attraverso dei canali di membrana detti MRP (*Multi-drug Resistant Protein*). Una volta escreti trovano il recettore sulla cellula bersaglio.

Vista la potente azione di queste sostanze, sono stati sviluppati dei **farmaci inibitori** che possono agire a diversi livelli:

Corticosterodi

Sono potenti infiammatori immunosoppressori che vengono usati spesso nel trattamento delle malattie infiammatorie croniche perché funzionano sempre, però sono anche molto tossici.

Sono in grado di inibire a vari livelli la sintesi dei mediatori lipidici:

- inibiscono la fosfolipasi A2 andando a legare dei recettori nucleari che attivano la trascrizione di determinati geni bersaglio oppure reprimono la trascrizione di altri geni;

- inducono la produzione di **lipocortina** (detta anche annessina 1), che ha la capacità di legare la fosfolipasi A2 e di inibirla; secondo alcuni la fosfolipasi A2 sarebbe sempre legata alla lipocortina e quando si attiva la lipocortina si stacca.

- vanno a bloccare NF-kB

Inibitori della ciclossigenasi/FANS

Il capostipite di questa classe di farmaci è l'**aspirina** (ASA) che, oltre a bloccare la via metabolica a valle della ciclossigenasi, ha numerose funzioni:

azione antitrombotica: blocca la produzione di trombossani;

azione antinfiammatoria: spegne la produzione di prostaglandine, prostacicline e altri composti;

azione analgesica: blocca la sintesi di prostaglandine coinvolte nella nocicezione;

azione antipiretica: blocca la produzione di PGE2, mediatore ultimo della febbre;

azione immunosoppressiva: l'aspirina e i suoi derivati possono anche agire nelle varie tappe delle risposte dell'immunità innata; per esempio possono bloccare il reclutamento dei leucociti andando ad inibire l'adesione, la transmigrazione e la chemiotassi, possono inibire la produzione di citochine infiammatorie, possono indurre apoptosi, possono agire anche durante la fase effettrice della risposta immunitaria andando ad inibire la maturazione delle cellule dendritiche e la presentazione dell'antigene;

azione TOSSICA a livello della mucosa gastrica e a livello renale (soprattutto se assunta a stomaco vuoto): causa ridotto flusso di sangue alla mucosa e ridotta secrezione di muco e di bicarbonato, che possono risultare in sanguinamenti e nella formazione di ulcere.

Lo studio degli effetti dannosi dell'aspirina e dei suoi derivati ha permesso di scoprire che ci sono diverse ciclossigenasi aspecifiche (sicure la COX1 e COX2, in forse COX3 e COX4).

la **COX1** è presente **costitutivamente** nella mucosa gastrica, nel rene e nelle piastrine ed esercita funzioni omeostatiche;

la **COX2** è **inducibile** da parte di citochine, endotossine e mitogeni ed è maggiormente coinvolta nelle funzioni patologiche.

Sono stati sviluppati dei farmaci inibitori specifici della COX2:

rofecoxib

celecoxib

etoricoxib

lumiracoxib

valdecoxib

Questi farmaci sono stati utilizzati negli ultimi anni soprattutto per il trattamento di malattie infiammatorie croniche e questo ha permesso di individuare degli **effetti collaterali** di questi farmaci molto potenti, specialmente in pazienti affetti da patologie cardiovascolari.

Oltre ai corticosteroidi e ai FANS esistono altri farmaci, soprattutto **antagonisti recettoriali** che possono inibire gli effetti biologici dei leucotrieni o dei trombossani.

Negli ultimi anni sono stati scoperti ulteriori derivati dell'acido arachidonico, le **lipossine**, la cui sintesi è mediata dalle lipossigenasi. Si è visto che questi composti hanno un'azione diversa rispetto ai composti precedenti: infatti hanno prevalentemente azione antinfiammatoria su diversi target.

Per la produzione delle lipossine occorre la collaborazione di 2 cellule (meccanismo di biosintesi transcellulare): i **neutrofili** esprimono la 5-lipossigenasi, mentre le **piastrine** esprimono la 12-lipossigenasi. Quindi i neutrofili producono LTA4 che può essere metabolizzato dalle piastrine e produrre le lipossine (LXA4, LXB4).

Le **epilipossine** sono dei composti analoghi che derivano per azione dell'aspirina. L'aspirina blocca le ciclossigenasi andando ad acetilare l'enzima. Nel caso della COX1 questo blocca la via metabolica a valle e quindi inibisce la sintesi dei prostanoidi. Nel caso della COX2 da un lato blocca la sintesi dei prostanoidi, dall'altro attiva un'altra via metabolica che si avvale del 15-(R)-HETE che può essere metabolizzato dalla 5-lipossigenasi dei PMN e quindi produrre le epilipossine (15-EPI-LXA4).

Anche le epilipossine hanno azione antinfiammatoria e agiscono su recettori legati a proteine G:

inibiscono la chemiotassi dei neutrofili

inibiscono la trasmigrazione

inibiscono l'adesione

inibiscono la degranulazione

inibiscono la produzione di superossido

Quindi, riassumendo, le lipossine e le epilipossine svolgono azioni antinfiammatorie:

sono coinvolte nella inflammation resolution;

regolano il traffico leucocitario;

stimolano il reclutamento dei monociti non flogistici;

favoriscono la fagocitosi dei corpi apoptotici;

ridirigono l'asse chemochina-citochina;

regolano l'azione dell'istamina e quindi riducono l'edema;

bloccano i segnali che portano dolore.

Le lipossine hanno diverse cellule bersaglio:

macrofagi

monociti

cellule endoteliali

cellule mesangiali

eosinofili

neutrofili

Prima di applicare una terapia si fanno dei modelli animali, per vedere se la somministrazione di questi composti in modelli animali ottiene un'azione antinfiammatoria. Per questo tipo di sostanze si sono ottenuti dei risultati e quindi ora ci sono dei trial clinici.

Dopo le lipossine sono stati scoperti altri composti derivati da acidi grassi polinsaturi diversi dall'acido arachidonico, come gli **ω-3**. Questi nuovi mediatori sono stati chiamati **resolvine**, **protettine**, etc, in quanto hanno azione antinfiammatoria e sono impegnati nella *inflammation resolution*, ossia la fase risolutiva dell'infiammazione acuta. Quando tutto procede bene sono prodotti in maniera ritardata rispetto ai classici mediatori per mediare il ritorno all'omeostasi.

bloccano la migrazione dei leucociti

bloccano la produzione di citochine proinfiammatorie (come IL-12, IL-1 β)

aumentano l'espressione di altri recettori per chemochine per favorire il richiamo di cellule che fagocitano le cellule morte

All'inizio della risposta infiammatoria acuta vengono prodotte prostaglandine e leucotrieni, poi se questa risposta infiammatoria acuta si risolve allora si verifica il class switching, cioè un cambiamento nella produzione di mediatori lipidici e vengono prodotte le lipossine, le resolvine, le protettine, etc. Quindi nella fase iniziale i mediatori stimolano l'aumento del flusso, l'aumento della permeabilità vascolare e il reclutamento dei leucociti, mentre nelle fasi finali grazie soprattutto alla azione dei mediatori antinfiammatori si ha lo spegnimento di questi fenomeni e questo contribuisce alla risoluzione dell'infiammazione.

Dall'azione della fosfolipasi A2 sui fosfolipidi di membrana si ottengono gli eicosanoidi, ma si libera anche il **lisofosfolipide** (in genere fosforilcolina). Il lisofosfolipide può a sua volta essere acetilato da una acetiltransferasi in posizione 2 e si forma il **PAF**, un altro potente mediatore proinfiammatorio.

Il rilascio dei PAF è stimolato da:

fattori chemiotattici

citochine

fagocitosi

IgE nei mastociti

Il PAF agisce su una varietà di cellule bersaglio legando il **PAF receptor**. Il PAF può anche agire in modo molto efficace in maniera autocrina se la cellula ha ricevuto stimoli adeguati.

Il PAF è un mediatore pleiotropico, cioè è in grado di esercitare azioni diverse su più tipi cellulari che esprimono lo stesso recettore:

eosinofili: chemiotassi

piastrine: aggregazione

monociti/macrofagi: aggregazione, chemiotassi, produzione superossido e prostaglandine

cellule epiteliali del rene

cellule del mesangio

cellule dell'endotelio vascolare

neutrofili

cellule della muscolatura liscia dei vasi

Il PAF è associato a varie patologie:

shock endotossico

malattie immuni

infarto del miocardio

asma

[*NdR: il professore illustra un elenco dei mediatori chimici dell'infiammazione visti finora nelle lezioni*]

Gli attori cellulari dell'infiammazione sono i leucociti (che sono TUTTI i globuli bianchi).

Granulociti (PMN)

Neutrofili

Eosinofili

Basofili

Cellule mononucleate

Monociti

Linfociti T

Linfociti B

Cellule NK

Cellule dendritiche

Cellule staminali

Nel sangue ci sono:

Piastrine

Globuli rossi

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 11/12/2012

Lezione Di Patologia del 11/12/12

Prof. Cassatella

Sbobinatore Trevisan Marta

Revisore Fraccaro Marta

Il professore parte da dove era rimasto e fa vedere una tabella con le funzioni dei protagonisti della risposta infiammatoria. (NdR)

PROTAGONISTI DELLA RISPOSTA INFIAMMATORIA

Questa tabella sintetizza al massimo le principali funzioni dei protagonisti della risposta infiammatoria dell'immunità innata e specifica: come vedete i **neutrofili sono importantissimi come prima linea cellulare di difesa contro le infezioni**. Questo è un concetto che vale sempre quindi indipendentemente da quello che dirò oggi: i neutrofili sono fondamentali per le funzioni di difesa. I neutrofili sono cellule che generalmente non si trovano nei tessuti, ma sono considerate cellule terminali, ovvero sono incapaci di proliferare.

I granulociti eosinofili sono cellule cruciali per l'uccisione di **vermi e macro-parassiti** in generale.
I neutrofili e gli eosinofili possono mediante il rilascio di sostanze tossiche determinare danno tissutale.

I monociti, che sono i precursori dei macrofagi nei tessuti, sono le **cellule chiave dell'infiammazione cronica**, in particolare i macrofagi sono i principali attori delle risposte effettrici durante un'infiammazione cronica in quanto:

- sono cellule a lunga sopravvivenza,
- possono essere rinnovate e agiscono in moltissime situazioni,
- possono proliferare e maturare,

- possono cambiare in quanto cellule molto plastiche.

Le piastrine sono importanti per la **coagulazione e i processi omeostatici**. Nell'infiammazione sono importanti perché sono in grado di rilasciare anch'esse una miriade di fattori.

Mastociti e i basofili sono cellule che dal punto di vista funzionale esplicano risposte simili ma non sono l'una il precursore dell'altra, quindi **i basofili** non sono i precursori dei mastociti. Contengono una grande quantità di **istamina preformata** che possono rilasciare nel giro di pochi minuti: l'istamina è uno tra i mediatori che possono essere rilasciati; possono rilasciare anche citochine che causano l'infiammazione.

I mastociti sono importanti perché sono importanti per rilasciare all'inizio questi **mediatori pro infiammatori che fanno scattare le fasi iniziali della risposta infiammatoria acuta**.

Poi ci sono:

i **linfociti** che appartengono all'**immunità specifica**;

le **cellule NK** (natural killer cells) che appartengono all'**immunità innata**, sono cellule capaci di ammazzare cellule bersaglio;

le **cellule dendritiche** che sono cellule di origine mieloide fondamentali: dal punto di vista numerico sono meno rispetto agli altri leucociti, ma sono le più potenti cellule capaci di **presentare l'antigene**;

le **cellule endoteliali** mediano lo **scambio di fluidi tra cellule** tra le barriere;

i **fibroblasti** che sono cellule della fase ripartiva e delle flogosi in quanto sono quelli che producono collagene e formano tessuto connettivo.

In fondo a questa diapositiva, oltre a illustrare gli aspetti principali dei mediatori prodotti da cellule attive, ci sono anche altre informazioni che tratteremo: come quel che riguarda le cellule morte che vanno incontro a necrosi e rilasciano il contenuto intracellulare, dei granuli intracellulari, come chemio tattico, che può funzionare da mediatore chimico e quindi può innescare, aumentare le risposte infiammatorie.

Questo è il vetrino di una goccia di sangue colorata (che è la prima cosa che vi faranno fare in clinica per mettere in risalto la vostra abilità nel colorare le cellule). Se i tempi e i metodi sono esatti potete colorare e identificare in questa maniera le cellule del sangue, che sono riconoscibili e distinguibili per la loro morfologia, dimensione e affinità alla colorazione.

Ci sono i globuli rossi come vedete, e poi, il motivo per cui ho messo questa diapositiva è per soffermarmi sulla **formula leucocitaria**, cioè la divisione in percentuale dei vari tipi di leucociti nel sangue, che voi dovete sapere (*il prof. Insiste molto su questo punto: bisogna sapere bene la formula leucocitaria)*

FORMULA LEUCOCITARIA

La formula leucocitaria è molto importante perché un'alterazione della formula leucocitaria può già dare un sacco di informazioni a livello di analisi o potenzialità di diagnosi di una determinata patologia. Quindi, come è scritto in questa figura:

1. **le cellule più numerose nel sangue sono i granulociti neutrofili** che variano dal **40-50 al 70 %** (percentuale normale). I neutrofili si riconoscono per la loro dimensione (8-10 micron), per la forma del nucleo, per il ricchissimo contenuto di granuli.

2. **I secondi sono i linfociti** che sono facilmente riconoscibili perché sono di dimensioni inferiori ai granulociti e hanno un nucleo molto grande rispetto al citoplasma; quindi il rapporto nucleo/ citoplasma è a favore del nucleo nel caso dei linfociti, che in questo caso non si possono distinguere in B o T. La percentuale dei linfociti varia **da 20 a 40 %.**

3. **Poi abbiamo i monociti** che sono cellule di grandi dimensioni, con il nucleo lobulare e citoplasma abbastanza abbondante, vedete **7-8 o al massimo 10%**, che poi danno origine ai macrofagi.

4. **Poi abbiamo i granulociti eosinofili** circa **1-3 fino a un 5%** (al 5% già si parla di eosinofilia) e i **basofili** che sono rarissimi, **0-1% circa**, che sono immediatamente identificabili perché sono queste pallottole blu scure: infatti i coloranti vanno a colorare il contenuto di questi granuli.

5. **Le piastrine vanno da 150.000 a 400.000 per millimetro cubo o microlitro.**

6. Mancano altre cellule come le **cellule dendritiche**, che sono di origine mieloide e sono mononucleate, che sono **3-4%** del totale delle **cellule mononucleate.** All'interno delle cellule mononucleate ci sono le cellule dendritiche.

7. **Poi le cellule NK** che sono all'interno della quota linfoide, che vanno dal **2-3 fino a 8% di linfociti** ; all'interno dei linfociti le cellule NK hanno una quota di massimo 10%.

Qui c'è la formula che dovete sapere, poi ci sono variazioni nella formula come:

- aumento del numero di leucociti e si parla di leucocitosi
- una diminuzione è leucopenia, nel numero totale di leucociti.

NB: La leucocitosi è solo assoluta, mentre all'interno della leucocitosi possiamo avere variazioni nel numero di vari tipi di leucociti, quindi abbiamo:

- linfopenia o linfocitosi,
- monopenia o monocitosi,

che possono essere assolute o relative in funzione del numero totale di leucociti.

Oltre alla formula cioè alla quantità percentuale dei leucociti dovete sapere anche il numero delle cellule dei vari tipi che sono il range diciamo normale dei leucociti nel sangue, quindi vedete il normal range dei leucociti va da 4500 a 11000, molto ampio come range:

I neutrofili sono le cellule maggiormente rappresentate,vanno da 1.800 a 7.700,

gli eosinofili da 0 a 450,

i basofili da 0 a 100,

i linfociti da 200 a 800-1000, tutti in numero di cellule per microlitro o mm cubo.

Delle cellule del sangue noi sappiamo tutto, o quasi tutto, perché continuiamo a scoprire un sacco di altre cose. Questo perché sono una fonte facilmente studiabile: infatti oggi ci sono metodi per isolare le cellule del sangue, in maniera più o meno sofisticata.

Una tecnica classica per l'isolamento delle cellule consiste in un prelievo di sangue che poi si diluisce con un tampone e si stratifica su una sostanza che ha una determinata densità, poi si centrifuga questa provetta e quello che succede è che i leucociti si separano sulla base della loro densità e quindi i granulociti vanno a finire sopra uno strato costituito dai globuli rossi, mentre le cellule mononucleate (monociti, linfociti,cellule dendritiche,cellule NK) vanno a stratificarsi sopra la banda dei granulociti. Le piastrine sono a livello del gradiente.

Tutte le cellule mononucleate vengono anche definite PBMC (peripheral blood mononuclear cells).

I granulociti della banda sono neutrofili e eosinofili, e sopra ci sono tutte le altre cellule.

Questa è una maniera per separare grossolanamente la parte mononucleata dai granulociti e poi studiarseli.

Oggi ci sono dei sistemi che permettono di isolare in maniera molto pura i vari tipi cellulari basandosi sull'uso di anticorpi che riconoscono degli antigeni di superficie che sono espressi in modo specifico da quel tipo cellulare.

Quindi si possono mischiare questi anticorpi, coniugati a biglie magnetiche, a una miscela di cellule così gli anticorpi si possono legare al bersaglio, cioè alla cellula che esprime quel determinato marcatore.

Ci sono strategie positive e negative:

- o direttamente con un magnete isolare l'anticorpo, cioè la biglia legata all'anticorpo e questo permette di isolare le cellule
- oppure per selezione negativa e quindi togliere tutte le cellule che non sono positive.

In questa maniera, con l'uno o con l'altro metodo, è possibile isolare una popolazione di cellule relativamente pura. Si usano ovviamente questi metodi per poi studiare il comportamento, l'espressione genica delle cellule isolate.

Quale dei due metodi è meglio? La selezione positiva, utilizzando un anticorpo che riconosce l'antigene sulla cellula e in questa maniera si può estrarre la cellula o la selezione negativa e quindi togliere tutto quello che non interessa e prendere quello che rimane secondo questa tecnica?

A questo punto ci sono una serie di domande degli studenti e risposte del prof: segue riassunto. (Ndr)

Ammettiamo che:

non ci siano problemi di costi (gli anticorpi della selezione negativa, essendo diversi per ogni tipo cellulare da eliminare, implicano un alto costo);

si compie correttamente l'isolamento delle cellule scelte (non ci sono contaminanti), staccare un anticorpo dalle cellule non è un problema,

si scelgono antigeni specifici e selettivi, in entrambe le tecniche e si ottengono popolazioni pure.

Quello a cui devo stare attento è essere certo che l'anticorpo che utilizzo non vada, legando l'antigene, a stimolare o modificare la cellula bersaglio, per cui la cellula che studio penso sia quiescente e in realtà era stata attivata dal legame con l'anticorpo.

Devo essere sicuro che l'antigene che lego sia muto, non provochi mutazioni, quindi la selezione migliore è quella negativa perché sono certo di eliminare tutto quello che non mi interessa e ottengo la cellula di studio pulita e quiescente.

Oggi ci sono altre strategie, come delle macchine basate sulla citofluorimetria a flusso che fa la stessa cosa: utilizziamo anticorpi in questo caso marcati con un colorante fluorescente, e possiamo usarne numerosi, (dipende dallo strumento). Ovviamente più anticorpi usiamo più aumentiamo il grado di specificità per cui noi alla fina coloriamo le cellule: lo strumento rivela il colorante fluorescente e nel caso di due coloranti possiamo immediatamente riconoscere quali sono i doppi negativi, i positivi, i doppi positivi.

Dopodiché lo strumento poi può sortare cioè selezionare le cellule che vogliamo, marcate con anticorpi e colorate come vogliamo attraverso un canale e quindi isolarle. Questa è una tecnica molto efficace.

Questo permette l'isolamento di pochissime cellule, quindi si possono studiare anche popolazioni di poche cellule e perciò è molto sensibile rispetto alla tecnica precedente delle biglie, ma è molto più lenta rispetto a quella delle biglie che si fa in pochi minuti.

Ora parliamo dei neutrofili.

I NEUTROFILI

I neutrofili sono le cellule della flogosi acuta, sono cellule che insieme ai macrofagi, alle cellule dendritiche e alle cellule NK rientrano nel compartimento cellulare dell'immunità innata.

Ci sono anche altre cellule.

Questa figura illustra i tipi cellulari dell'immunità innata, deputata alle risposte rapide e le cellule dell'immunità adattativa. Quindi i granulociti, neutrofili e eosinofili, cellule NK, monociti e macrofagi cellule dendritiche e mastociti tra le cellule dell'immunità non specifica.

Poi ci sono altre cellule un po' *border line* che non trattiamo che sono cellule miste: sono le *γδ T-cell*, che sono cellule sicuramente leucocitarie di tipo linfocitario, ma che svolgono un ruolo importante a livello di immunità innata e poi ci sono queste cellule miste *NK-Tcell (natural killer T cell)*: anche queste sono cellule che fanno da ponte tra l'immunità innata e l'immunità specifica, soprattutto implicate in alcuni casi di risposte rapide piuttosto che in quelle ritardate dell'immunità specifica.

Poi per la cronaca negli ultimi due anni sono state identificate anche altre cellule di cui sentirete parlare e sono le *innate linfoid cells* che sono cellule linfocitarie, quindi di origine linfoide, che non hanno il recettore delle cellule T riarrangiato, cioè non hanno il TCR. Ma sono cellule capaci di produrre ed esprimere fattori trascrizionali tipici delle cellule T polarizzate. Vedete qui a sinistra nel topo e a destra nell'uomo (sono molto più studiate e conosciute di quelle del topo). Quindi sulla base delle loro capacità di produrre citochine, interferon-γ, IL-5 si suddividono in gruppi e si localizzano prevalentemente nei distretti che fanno da barriera quindi nelle mucose, nei polmoni e in altri organi e hanno varie funzioni.

Piano piano si sta arrivando a capire queste funzioni, cioè sono quei linfociti innati che non riconoscono l'antigene perché non hanno il T cell receptor però producono molte citochine quindi questo indica come vedremo, e il concetto vale anche per le cellule dell'immunità innata, una certa plasticità di queste cellule che possono ampliare le funzioni e fare un sacco di cose nell'ambito dei diversi compartimenti.

L'immunità innata, di cui i neutrofili fanno parte, come già sapete è quella risposta che può intervenire in quelle fasi iniziali dell'infezione con un meccanismo di difesa per eliminare la causa, per preparare e dare il tempo all'immunità specifica di formarsi e anche di collaborare con la stessa immunità specifica ai fini delle funzioni che le competono.

L'immunità innata è sempre presente, costitutivamente presente, e pronta ad agire.

I neutrofili rientrano comunque in questo compartimento dell'immunità innata.

Questa figura praticamente sintetizza quasi tutta la biologia dei neutrofili quindi in maniera molto sintetica:

i neutrofili sono prodotti dal midollo osseo nell'ordine di 1 miliardo di cellule per kilo al giorno quindi sono cellule che hanno un rapido turnover: vengono prodotti, vengono quasi totalmente rilasciati in circolo.

In circolo sopravvivono probabilmente per poco tempo, sicuramente un tempo inferiore rispetto agli altri leucociti, ed entrano in circolo per vedere se sta succedendo qualcosa, perciò hanno una funzione di controllo.

Se succede qualcosa quindi avviene una risposta flogistica: perciò l'endotelio come avete imparato comincia a modificarsi, allora queste cellule escono dal sangue e penetrano nei tessuti e svolgono le loro funzioni effettrici: sono richiamati da fattori chemio tattici, poi a livello locale sono attivate e indotte alla fagocitosi e alla distruzione di agenti patogeni (soprattutto batteri e funghi) attraverso tutta una serie di azioni biologiche, che abbiamo già trattato e che oggi rivedremo, e svolgono anche altre funzioni che sono state scoperte negli ultimi anni.

Quindi non solo sono cellule importantissime per i meccanismi rapidi della flogosi acuta, ma sono cellule che possono influenzare le risposte e gli eventi successivi alla risposta immunitaria sia innata che specifica, attraverso per esempio la produzione di citochine e altri meccanismi.

Queste cellule sono prodotte dal midollo osseo e in istologia avete studiato sicuramente le varie tappe maturative della cellula, dal precursore della cellula mieloide, la cellula staminale, il precursore dei leucociti si indirizza verso il precursore mieloide il quale poi nel giro di una settimana-dieci giorni subisce diverse tappe maturative fino a dare origine ai neutrofili maturi. Questi entrano in circolo, come dicevo prima.

Questo processo di maturazione è legato alla produzione di fattori di crescita e citochine che agiscono a livello del midollo e che informano le cellule immature a maturare verso una certa linea mieloide: nel caso dei neutrofili si conoscono parecchie citochine che agiscono lungo i vari stadi di maturazione.

Quindi a monte per la maturazione dei neutrofili sono importanti lo SCF (stem cell factor), IL-3 e il GMCSF, di cui parleremo in dettaglio.

GCSM - Granulocyte Colony Stimulating Factor –

Man mano che differenziano, i neutrofili richiedono una citochina, che è quella specifica per queste cellule, che è il **GCSF, il granulocyte colony stimulating factor** (il fattore chiave è proprio questo).

Le altre collaborano, potenziano, amplificano questa risposta.

Se uno vuole indurre la produzione di neutrofili deve usare il GCSF: in clinica nelle situazioni in cui c'è una neutropenia legata a varie cause, i pazienti possono essere trattati con GCSF oppure anche con GMCSF secondo le indicazioni.

Il GMCSF è invece una citochina che favorisce la maturazione dei neutrofili e dei monociti (granulocyte macrophage colony stimulating factor).

Queste cellule entrano in circolo e sopravvivono per poche ore (8-10 ore) poi, se non sono reclutate a livello del sito infiammatorio, praticamente invecchiano spontaneamente, e alla fine muoiono per apoptosi o meglio

una parte invecchia e torna nel midollo dove vengono eliminate e una parte muore per apoptosi e queste sono uccise nella milza o nel polmone dai macrofagi.

Adesso ci sono dei nuovi lavori che direbbero che questa presunta breve vita dei neutrofili va rivista concettualmente perché si sono utilizzate nuove marcature e si è visto che le cellule in realtà possono sopravvivere per più giorni invece che per ore, anche per 3-4 giorni.

Se questo è vero, oltre al fatto che vanno nei tessuti e i neutrofili possono sopravvivere più a lungo perché nell'ambiente incontrano dei fattori che favoriscono la loro sopravvivenza, fa cambiare la maniera di vedere queste cellule dal punto di vista funzionale.

Se c'è un danno, e quindi è in corso una reazione infiammatoria, allora i neutrofili sono reclutati secondo le esigenze che vi ho già descritto nei tessuti, per essere poi attivati e stimolati dall'agente eziologico a esplicare le loro funzioni.

Poi, se ricordate, durante questo processo della migrazione e della chemiotassi nei tessuti queste cellule si attivano e si modificano dal punto di vista funzionale per cui quando sono stimolate dall'agente eziologico rispondono in maniera molto potente e quindi compiono la fagocitosi (di cui parleremo la prossima volta) oppure possono essere stimolate a liberare e rilasciare le sostanze contenute nei granuli, possono essere stimolati a produrre superossidio o a fare altre cose che vedremo.

Concettualmente volevo solo ricordarvi l'importanza dei fattori chemiotattici, che sono tanti, e quindi i mediatori che inducono la produzione di fattori chemiotattici per i neutrofili, che sono ridondanti e sono tantissimi.

Oggi sappiamo che in realtà questo richiamo dei neutrofili viene secondo una serie di fasi in sequenza che possono essere ciascuna regolata da una serie di fattori chemiotattici.

Quindi quando un anatomopatologo vede il tessuto fissato con dei neutrofili, vede la fotografia di una cosa che ha visto il susseguirsi di una serie di eventi che noi evidentemente abbiamo perso.

FUNZIONI DEI NEUTROFILI

Un’azione importante dei neutrofili è il fatto che **migrano** (oltre alla fagocitosi che è essenziale) e quindi la reazione stereotipata della flogosi acuta, che consiste negli eventi che ho descritto, è quella di richiamare i neutrofili: questo perché alla fine l’organismo indipendentemente dalla causa pensa che ci sia un’infezione acuta e quindi richiama i neutrofili per far fuori i batteri, altrimenti questi proliferererebbero rapidamente.

Poiché i neutrofili sono le cellule più numerose nel sangue e sono le più potenti nel caso della fagocitosi, questo è il senso del richiamo di neutrofili nel caso della flogosi acuta.

Indipendentemente dalla causa quindi queste cellule sono fondamentali per la fagocitosi e l’uccisione dei microrganismi.

Negli ultimi anni si è scoperto che queste cellule possono svolgere anche altre funzioni: parleremo di questo processo che è stato scoperto, ovvero della **formazione di NETs (neutrophil extracellular traps)** che consistono nel rilascio di cromatina decondensata associata al contenuto di granuli.

Sono delle reti che intrappolano i batteri e che concentrano gli enzimi e il contenuto di granuli. Queste sostanze andrebbero in teoria, anche se non c’è ancora alcuna evidenza, ad uccidere questi batteri intrappolati. Quindi è una modalità diversa dalla fagocitosi, un’uccisione extracellulare dei microbi. Questa formazione di NETs prende il nome di **nettosi**, **è una forma di morte dei neutrofili che dovrebbe favorire l’intrappolamento e l’uccisione dei microbi**.

Poi in una situazione infiammatoria possono anche rilasciare e produrre citochine e altri mediatori che possono amplificare la risposta.

Quindi di questo abbiamo già parlato andiamo oltre.

Importantissima la **fagocitosi** che è una funzione fondamentale.

Se ricordate nella fagocitosi la cellula necessita di riconoscere un componente estraneo e questo avviene in maniera diretta o indiretta.

Diretta perché magari il neutrofili, così come gli altri fagociti, hanno dei recettori specifici che riconoscono dei ligandi espressi dal microrganismo oppure indiretta perché il microrganismo viene opsonizzato da varie altre particelle e vari altri mediatori in grado di riconoscere il microbo, ricoprirlo e essere a loro volta riconosciuti da recettori specifici che si trovano su neutrofili o altri fagociti.

In questo caso, come riporta la figura, è il recettore per la frazione cristallizzabile delle immunoglobuline Fc receptor.
Un’opsonina molto potente che deriva dal complemento è C3b e C3d e poi tutti i vari prodotti della degradazione di C3d.

Ricordate che C5a è un’anafilotossina con azione chemiotattica e attiva la degranulazione dei mastociti, libera istamina e induce fenomeni legati al tono vascolare e alla dilatazione dei vasi.

Quindi i neutrofili sono cellule che interagiscono con l’ambiente perché esprimono tantissime classi di recettori, come per esempio:

- gli FcγR che riconoscono anticorpi oppure particelle opsonizzate da anticorpi
- vari recettori che riconoscono frammenti del sistema di attivazione del complemento ad esempio CR1
- tantissimi recettori per citochine che possono rispondere a citochine come vedremo
- molecole di adesione di cui abbiamo già parlato
- altri recettori come ad esempio un recettore (*vedi figura*) che ha un’influenza negativa sui neutrofili, spegne il neutrofilo attivato e quindi le risposte effettrici
- recettori che riconoscono i PAMP, tra questi alcuni Toll-like receptors che poi faremo più in dettaglio.

Il neutrofilo esprime quasi tutti, ma non tutti, come poi vedremo, i recettori per riconoscere gli antigeni.

Poi ad esempio l'anno scorso è uscito questo lavoro interessante che ha chiarito alcuni aspetti delle reazioni flogistiche nei soggetti allergici: è stato dimostrato nel topo che, oltre ai mastociti e ai basofili, che attuano meccanismi per scatenare reazioni allergiche acute attraverso FcεR che lega le IgE e altri recettori FcγR3 che legano altre immunoglobuline, anche i neutrofili possono mediare queste reazioni in quanto esprimono questo recettore FcγR4.

Nel topo di FcγR fino a 4 anni fa se ne conoscevano di tre tipi (1, 2, 3), poi è stato clonato questo FcγR4, che esiste solo nel topo, espresso da neutrofili che può mediare le reazioni allergiche.

L'attivazione di questo FcγR4 induce la produzione e il rilascio di PAF, non produzione di istamina: anche se poi si è scoperto che nel topo possono anche produrre istamina, il meccanismo di questi modelli è legato alla produzione di PAF.

Quindi nel topo (non è ancora dimostrato nell'uomo perché FcγR4 non è espresso sui neutrofili umani) i neutrofili possono partecipare alle reazioni allergiche.

Questo però spiega perché anche nell'uomo quando si studia il lavaggio dei soggetti allergici in certe situazioni possono essere ricchissimi di neutrofili che non ci dovrebbero essere quindi anche nell'uomo magari esiste una situazione analoga a quella vista nel topo, magari mediata da un altro recettore.

Poi non solo, quando parleremo di TLR o più che altro di questi PRR (pattern recognition receptor) che continuano ad essere scoperti, vedremo che negli ultimi anni si è scoperta la categoria di una nuova classe di recettori intracellulari capace di riconoscere i PAMP dei patogeni.

In modo particolare sono stati identificati una serie di recettori intracitoplasmatici in grado di riconoscere gli acidi nucleici a cui appartengono varie classi: quindi i recettori che riconoscono RNA, DNA, SSRNA, DSRNA di derivazione virale o batterica.

Questi sono fondamentali per l'attivazione delle cellule a produrre una serie di mediatori, gli interferoni per esempio, che sono essenziali per esempio per la difesa dalle infezioni virali.

Anche i neutrofili possono esprimere alcuni di questi recettori e questo ci dice quindi che anche i neutrofili potrebbero essere infettati da virus o potrebbero rispondere a infezioni virali oppure potrebbero essere infettati da batteri intracellulari che rilasciano acidi nucleici e che possono dimostrare un'altra nuova funzione di queste cellule.

Questa è un'immagine al microscopio elettronico che vi mostra un neutrofilo.

I granulociti sono cellule ricchissime di granuli di varie dimensioni e di varia natura, sono come sacchetti di granuli. Questi granuli sono diversi dal punto di vista morfologico e dal punto di vista del loro contenuto. Oggi conosciamo e classifichiamo sostanzialmente tre tipi di granuli: i granuli primari, secondari e terziari:

1. **granuli primari o azurofili,**
2. **granuli secondari o specifici e**
3. **granuli terziari o ricchi dell'enzima gelatinasi.**

Poi esiste un **quarto tipo di granuli che si chiamano vescicole secretorie**, che in realtà derivano dalla endocitosi, dal processo endocitotico che racchiude sostanze che si ritrovano nell'ambiente: quindi a differenza dei granuli primari secondari e terziari, che si formano durante la maturazione a livello del midollo, le vescicole secretorie derivano dal fatto che i neutrofili endocitano sostanze dell'ambiente e poi le racchiudono al loro interno.

Queste sostanze dell'ambiente possono magari essere immagazzinate e facilmente rilasciate o degranulate.

Questa terminologia di granuli primari secondari e terziari (che corrispondono alla denominazione azurofili specifici o con gelatinasi) si chiamano così perché la denominazione si basa sulla loro comparsa durante il processo di maturazione: quindi i granuli primari sono primari perché sono quelli che compaiono già a livello di mieloblasto e poi mielocita e così via secondari si formano dopo i primari ecc..

Già questa figura vi fa vedere le sostanze che sono contenute in maniera specifica in questi granuli:

ad esempio **i granuli primari sono ricchi di mieloperossidasi**, che è uno degli enzimi specifici dei neutrofili.

La mieloperossidasi rappresenta quindi un marcatore dei neutrofili: se uno vuole per esempio in un tessuto quantificare il contenuto dei neutrofili può andare a misurare o colorare l'anticorpo e fare un test per vedere la quantità di mieloperosidasi, questa può dare sicuramente un'idea di quanto quella situazione è ricca di neutrofili.

Altri marcatori per esempio **dei granuli secondari è la lactoferrina**, **il marcatore dei terziari è la gelatinasi**.

Qua vedete un'altra informazione che vi dà questa tabella ovvero la facilità con la quale questi granuli sono esocitati dalla cellula, quindi per esempio le vescicole secretorie sono facilmente esocitabili: il contenuto di queste vescicole secretorie è facilmente rilasciabile dai neutrofili, basta toccarli e questi rapidamente rilasciano il contenuto delle vescicole. Ci vogliono invece dei segnali molto più forti per indurre il rilascio dei granuli primari che contengono sostanze molto più pericolose per quel che riguarda il danno ai tessuti.

Questi granuli contengono tantissime sostanze. E' stata fatta la proteo mica qualche anno fa e non mi ricordo se sono state scoperte 3.000 o 30.000 proteine, comunque tantissime proteine che in questa tabella sono state classificate sulla base della funzione.

All'interno dei granuli ci sono proteasi quindi enzimi in grado di degradare substrati, proteine antibatteriche, molecole di adesione, recettori che possono essere rapidamente espressi sulla membrana e quindi cambiare la faccia al neutrofilo e altre classi di proteine con una serie di funzioni.

Quindi all'interno di questi neutrofili sono contenuti proteine, enzimi che possono fare tantissime cose.

Degli **enzimi lisosomiali** abbiamo già parlato: ricordiamo la loro importanza come mediatori pro infiammatori, non solo per la loro azione specifica enzimatica, ma anche perché poi possono amplificare la produzione di altri mediatori pro infiammatori, per esempio andando a degradare i componenti dei sistemi polimolecolari solubili quindi generare prodotti di degradazione biologicamente attivi.

I neutrofili possono rilasciare delle **sostanze che durante la trasmigrazione possono favorire l'aumento di permeabilità:** infatti tra i meccanismi che spiegano l'aumento di permeabilità ci può essere anche un'azione dei leucociti (dei neutrofili in questo caso), sia perché rilasciano sostanze contenute nei granuli durante il processo, sia perché magari hanno azione tossica. Il tutto può favorire il aumento di permeabilità.

I neutrofili poi contengono **sostanze che hanno una potentissima azione microbicida**, alcune delle quali sono elencate qui ma non sono le uniche:

- ci sono dei **peptidi antimicrobici cationici**, tra questi si conoscono le **defensine** (le α-defensine e le β-defensine). I neutrofili sono le cellule che producono le α-defensine, mentre le β-defensine sono prodotte dai cheratinociti della cute: sono sostanze che hanno prettamente un'azione antimicrobica e possono anche permeabilizzare la plasmamembrana dei batteri gram-negativi e possono anche attivare altri meccanismi.
- **LL37 è un'altra proteina cationica** che facilita la formazione di pori,
- **BPI (bactericidal protein**) è un'altra proteina che lega e inibisce LPS
- poi altri **enzimi proteolitici,** es. lisozima che degrada la parete dei batteri,
- poi ci sono **altre proteine** come la **lactoferrina** che lega il ferro quindi chela il ferro e il ferro è importante per la proliferazione dei batteri e altri enzimi che vedrete.

Quindi queste proteine svolgono un'azione specifica mirata a neutralizzare una reazione antimicrobica però possono anche, come si è scoperto in questi ultimi anni, attivare delle risposte che prima non si potevano immaginare: per esempio alcune proteine contenute nei granuli sono in grado di funzionare come agenti chemio tattici, quindi sono in grado di reclutare cellule e vari tipi di leucociti. Non entro in dettaglio, ma monociti e cellule dendritiche possono essere reclutate da questi tipi di proteine, poi vedremo anche come fanno.

Per esempio la catepsina G che è un enzima quindi degrada proteine bersaglio, guardate quante altre cose riesce a fare:

- ha azione vasodilatatoria,
- può stimolare la produzione di citochine,
- può agire come fattore chemiotattico,
- può modulare in vitro l'infettività di HIV,
- può stimolare la proliferazione di linfociti T

Quindi tantissimi effetti slegati dalla sua attività enzimatica e lo stesso vale per le defensine che hanno effetti antimicrobici, ma possono anche attivare la degranulazione dei mastociti, indurre la chemiotassi ecc..

Questo perché queste proteine possono legarsi a recettori espressi dalle cellule, a vari recettori con funzioni note: ad esempio la ***neutrophilin elastase*** che è un'altra proteina.

L'elastasi è un enzima che degrada l'elastina. Vedete qui l'elastasi può legarsi al TRL4, alle cellule che hanno il TLR4, che è un recettore che normalmente riconosce LPS e stimola la produzione di citochine e chemochine, e alla fine quindi l'elastasi può attivare la produzione di citochine, che è un'attività diversa da quella di degradazione di questo enzima.

Allora riassumendo, principali funzioni dei neutrofili (*qua il prof va via veloce e fa vedere una serie di immagini: vedi slide:*

1. fagocitosi importantissima: qua vedete un esperimento in vitro giusto per farvi vedere la capacità di queste cellule di ingerire: in questo caso si tratta di globuli rossi opsonizzati, possono ingerire fino a sette globuli rossi dentro a una sola cellula quindi sono potentissimi sotto il punto di vista della fagocitosi, dato che riescono a fagocitare fino a sette globuli rossi opsonizzati.
2. Questa è un'altra funzione di cui vi parlavo, la formazione di NETs. Questa è un'immagine al microscopio confocale che vi fa vedere un neutrofilo attivato che butta fuori il DNA, che si può così colorare, nel processo chiamato nettosi.

Poi altre risposte funzionali sono:

- il cambiamento di forma
- la formazione di lamellipodi, che sono importanti per il movimento oppure per il passaggio attraverso le cellule endoteliali
- variazioni di volume
- adesione a superfici
- chemiotassi
- aggregazione

- esocitosi
- possibilità di produrre mediatori ed eicosanoidi, ad esempio il PAF
- possibilità di produrre ossido nitrico, nel topo sicuramente, nell'uomo in certe situazioni
- possibilità di produrre radicali liberi dell'ossigeno attraverso la maturazione dell'NADPH ossidasi attraverso il respiratory burst all'interno del fagolisosoma, con la maturazione della NADPH ossidasi e la partecipazione dei granuli che favoriscono la produzione di tutta una serie di mediatori tossici, come l'anione superossido, l'acqua ossigenata, vari radicali dell'ossigeno e altri ancora.

Ricordate che questi rappresentano i meccanismi ossigeno dipendenti poi ci sono quelli ossigeno indipendenti.

NB: Attraverso la produzione di queste sostanze i neutrofili possono anche provocare danno tissutale: se c'è una produzione eccessiva, che perdura, i radicali liberi dell'ossigeno, i metaboliti e i derivati dell'acido arachidonico, l'anione ipoclorito possono venire rilasciati all'esterno e possono danneggiare le cellule vicine nel tessuto e quindi amplificare il danno e provocare la risposta infiammatoria (**tissue injury by inflammatory cells).**

Quindi alcuni meccanismi attraverso cui i radicali dell'ossigeno possono provocare danno:

- passano attraverso le membrane e possono quindi reagire col DNA e provocare mutazioni: questo è uno dei meccanismi che lega l'infiammazione al cancro,
- possono ossidare i gruppi solforici e quindi possono denaturare le proteine e
- possono degradare la matrice extracellulare.

Per esempio il rilascio di enzimi lisosomiali può degradare non solo i microrganismi ma anche danneggiare l'ambiente extracellulare. Ovviamente esistono dei sistemi di inibizione dell'attività enzimatica legati all'azione degli inibitori delle proteasi di cui vi ho già parlato.

HUMAN INFLAMMATORY DISEASES

Sono una serie di patologie in cui si tenta di inibire o il reclutamento o le funzioni effettrici dei neutrofili in quanto queste cellule vanno viste come patogenetiche: danno da riperfusione dopo ischemia, enfisema, artrite reumatoide, gotta (infiammazione acuta delle articolazioni).

Alcune funzioni biologiche nuove scoperte in questi ultimi anni sono per esempio il ruolo dei neutrofili nella fase risolutiva della risposta infiammatoria che dipende dal fatto che se la risposta infiammatoria procede in maniera corretta, come nella flogosi acuta, allora il neutrofilo dopo che ha svolto il suo ruolo muore per apoptosi quindi una morte silente, diversa dalla necrosi.

La necrosi è la **morte che causa la rottura della cellula e il rilascio all'esterno del contenuto intracitoplasmatico**, quindi nel caso di neutrofili il rilascio di enzimi tossici in grandissima quantità in maniera incontrollata che provocano danni tissutali e potenziano e cronicizzano l'infiammazione della risposta infiammatoria.

L'apoptosi invece è una morte silente in cui non c'è la rottura della cellula e dei granuli e non vengono rilasciate queste sostanze intracitoplasmatiche o dei granuli.

Quindi i neutrofili apoptotici vengono fagocitati dai macrofagi e degradati o da macrofagi tissutali o da monociti che sono richiamati da meccanismi della ***resolution inflammation***.

(*Segue domanda studente e ripetizione dei concetti suddetti*

D: La necrosi è programmata?

R: No la necrosi avviene se c'è un insulto molto forte e il neutrofilo muore, l'apoptosi è una morte programmata, mentre la necrosi causa un danno grave. La cellula muore, si disgrega e rilascia all'esterno il contenuto e quindi nel caso dei neutrofili il contenuto è dato dai granuli che contengono grandi quantità di enzimi e proteasi che poi vengono liberati e svolgono la loro azione tossica in maniera incontrollabile. Invece nell'apoptosi questo non avviene perché alla fine si formano dei corpi apoptotici che racchiudono all'interno il contenuto della cellula, questa viene definita morte silente).

Quindi i granulociti che vanno incontro all'apoptosi sono fagocitati dai macrofagi e questa fagocitosi di corpi apoptotici determina una riprogrammazione di queste cellule: non si attivano come succederebbe se fagocitassero batteri o altre sostanze. Nel caso della fagocitosi di corpi apoptotici, derivati dall'apoptosi di cellule, mediata da recettori specifici, queste cellule cambiano faccia, si riprogrammano e producono mediatori antinfiammatori soprattutto citochine antinfiammatorie come IL-10 o il TGF-β.

Queste vanno ad inibire il macrofago e a inibire le funzioni pro infiammatorie del macrofago: quindi questa fagocitosi innesca la produzione di altri mediatori antinfiammatori e serve a innescare la fase di risoluzione dell'infiammazione.

Poi sempre a questo riguardo è stata scoperta un'altra funzione interessante di questo processo della fagocitosi fatta da parte dei macrofagi dei corpi apoptotici dei neutrofili perché è stato correlato alle risposte dei TH17.

I linfociti TH17 sono cellule polarizzate che hanno una risposta dell'immunità specifica contro i batteri extracellulari. I TH17 polarizzati producono una serie di citochine, tra cui IL-17 e altre, che hanno lo scopo di reclutare i neutrofili.

Quindi i TH17 si servono dei neutrofili per eliminare questi batteri extracellulari.

Tra i vari meccanismi utilizzati dall'IL-17 prodotta dai TH17 per esempio vi è la stimolazione su cellule bersaglio della produzione di GCSF, citochina che a livello del midollo osseo promuove la maturazione e la liberazione di neutrofili.

Quindi TH17, tra le altre funzioni, attivano la produzione di GCSF per favorire una produzione continua di neutrofili in modo da reclutarli e aumentare il livello di risposta.

Nelle infezioni quindi c'è una neutrofilia, cioè un aumento di neutrofili nel sangue, perché durante l'infezione si producono fattori di crescita che agiscono sul midollo per far produrre neutrofili e rifornire continuamente l'organismo di cellule capaci di eliminare i batteri. Vi ricordo che abbiamo bisogno di rifornimento perché i neutrofili sopravvivono poco.

Ora se tutto va bene, cioè se l'infezione si risolve, i neutrofili apoptotici oltre a fare ciò che ho detto prima quando sono fagocitati dai macrofagi, oltre a indurre la produzione di IL-10, TGFβ ecc. spengono anche la produzione di mediatori pro infiammatori tra cui IL-23.

IL-23 come voi sapete è una delle citochine che sostengono la maturazione dei TH17 (la maturazione dei TH17 è formata da diverse fasi, ciascuna delle quali è modulata da citochine).

Molto importante è IL-23 per mantenere e favorire la maturazione dei TH17, quindi mancando IL-23, diminuiscono i Th17, diminuisce IL-17 e di conseguenza diminuisce la produzione di GCSF: si instaura in pratica un feedback che fa sì che anche da parte del midollo si spenga la produzione dei neutrofili.

Quindi questo è un altro risvolto del controllo della fase della risoluzione dell'infiammazione da parte della fagocitosi di neutrofili apoptotici che vengono fagocitati: i macrofagi producono mediatori anti-apoptotici e innescano una cascata che serve a spegnere il rifornimento da parte del midollo di nuovi neutrofili.

Quindi ricordate l'importanza dei neutrofili e della morte dei neutrofili per quanto riguarda lo spegnimento della flogosi e la partecipazione alla fase risolutiva dell'infiammazione acuta.

Poi ci sono altre scoperte fatte in questi ultimi anni che hanno rivoluzionato l'idea che queste siano cellule che vivono poco, uccidono i batteri e muoiono. In realtà non è così.

Primo queste cellule possono rispondere alle citochine, quindi rispondono all'ambiente.

Secondo non solo le citochine, ma anche ad esempio i ligandi dei TLR possono attivare i neutrofili e modificare lo stato funzionale di queste cellule (attivandole o disattivandole).

Quindi da una parte modificano lo stato funzionale, dall'altra parte, in una situazione flogistica, possono promuovere e allungare la sopravvivenza: quindi invece di morire in poche ore i neutrofili possono, in un tessuto infiammato, durare anche vari giorni.

Quindi alla fine questo processo di modificazione dello stato funzionale con il potenziamento della capacità di rilasciare enzimi, fagocitare, produrre citochine, ecc. non fa altro che aumentare le funzioni dei neutrofili durante l'infiammazione acuta. E questo potenziamento dell'azione dei neutrofili si esplica ad esempio nell'aumentata capacità di produrre radicali liberi dell'ossigeno perché queste sostanze fanno aumentare il contenuto di enzima. Una classica citochina che fa questo è IFNγ e potenzia le capacità killing- citocide dei neutrofili nei confronti di tutta una serie di microrganismi come batteri funghi protozoi e altri.

I neutrofili sono quindi cellule che possono essere potenziate dal punto di vista della funzione.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 12/12/2012

Fisiopatologia

lezione 12/12/12

prof. Minuz

Tornando sulle problematiche relative allo stato di disidratazione ricordiamo come sia estremamente facile incorrere in questa condizione, dal momento che l'assunzione dell'acqua è un atto volontario e quindi l'integrità dell'organismo dipende dal mantenere un equilibrio idroelettrolitico costante. Abbiamo anche visto che ci sono numerosi meccanismi che permettono di avere un costante equilibrio tra entrate e uscite, sia per l'*acqua* che per il *sodio* (che ricordate essere il principale soluto nello spazio extracellulare e il cui patrimonio complessivo viene mantenuto con grande attenzione da parte dell'organismo). Queste due sostanze sono fondamentali e, qualora ci fosse una mancanza di una delle due, si attuano una serie di meccanismi che tendono a recuperarli il più possibile e il principale regolatore in condizioni fisiologiche nel controllo dei volumi dei soluti e del volume è il rene.

Eravamo arrivati alle ultime considerazioni riguardo all'equilibrio idrosalino e alle condizioni di espansione dei volumi.

La condizione meno frequente a verificarsi è un aumento di volume, poichè richiede un *eccesso di entrata* (e non è facile che un eccesso di entrata determini ritenzione idrosalina perchè i meccanismi sono tali ,come ricordate, per cui l'aumento dell'introito idrosalino tende ad aumentare la diuresi e questo permette di mantenere l'equilibrio). Quindi: perchè si abbia un aumento di volume io devo presupporre di trovarmi in condizioni che siano di patologia in cui si esplicano meccanismi fisio-patologici di cui il principale è sicuramente un'inadeguata escrezione di acqua e di sodio. Si può creare quindi una condizione di espansione di volumi quando ci sia l'incapacità di eliminare h2o e sodio, come accade nelle fasi più avanzate *dell'insufficienza cardiaca, dello scompenso cardiaco* e in condizioni di *insufficienza renale* (dato intuitivo: se la capacità del rene di eliminare soluti è ridotta è verosimile si possa creare una condizione di espansione di volumi!). Oppure altre condizioni, come vedremo più avanti, per esempio l'*iperaldosteronismo*, dove un eccesso di produzione di aldosterone provoca un continuo recupero in eccesso di H20 e Na

(soprattutto di quest'ultimo a livello del tubulo collettore), e questo determina di per sè un incremento del patrimonio idrosalino, determinando uno squilibrio (si sente poco) della quantità uscente.

Vedremo quali conseguenze diverse hanno, in termini di ritenzione di h20o e Na, lo scompenso cardiaco, l'iperaldosteronismo e anche l'insufficienza epatica , che con meccanismi diversi, è uno dei principali trigger, (da ricordare soprattutto il meccanismo della cirrosi epatica che determina con una serie di riarrangiamenti funzionali del circolo sistemico) di una Condizione per la quale si determina un continuo recupero di acqua e sodio a livello renale.

àE' più difficile che un aumentato introito salino possa determinare una ritenzione idrosalina. Questo perché la capacità del metabolismo renale nei confronti di acqua e sodio è estremamente ampia: voi potete ampliare enormemente i volumi e l'introito salino e questo non determina di per sè un eccesso di ritenzione oltre una soglia, per una serie di motivi che vedremo essere essenzialmente legati al fatto che aumentando i volumi e la ritenzione di acqua e di sodio si incrementa la *pressione arteriosa* e questo è un determinante sufficiente ad incrementare le uscite; quindi questo ripristina l'equilibrio.

Quindi la regola generale, che determina un eccesso di volume e un eccesso di ritenzione idrosalina, è la presenza di uno squilibrio tra entrate ed uscite. (se un rene è capace di eliminare meno sale ogni eccesso dell'introito salino rispetto al valore escreto determina uno stato di ritenzione). Come vedremo questi sistemi si equilibrano attraverso variazioni di flussi e di pressioni.

Un eccesso di volume si presenta ovviamente come un eccesso di peso corporeo, che rappresenta un buon indice. Tuttavia la ritenzione idrosalina, come vedremo nello scompenso cardiaco non è detto che determini di per sè edema (perché si instauri questo deve esserci un incremento del patrimonio salino e un aumento di volumi nel comparto extracellulare). Di solito un incremento del volume plasmatico è facilmente riconoscibile perché il volume ematico aumentato determina un maggior riempimento arterioso ed un polso più pieno. Abbiamo visto come nello stato di disidratazione la concentrazione di proteine tende a salire e discendere nell'iperidratazione perché la componente idrica diluisce nel volume complessivo le sostanze in soluzione. L'aumentata pressione e l'aumentato volume sanguigno determina delle condizioni di alterazione degli scambi a livello del circolo capillare polmonare.

Rif a diapositiva che mostra le conseguenze in riferimento all'aumento dei soluti.

Di solito un incremento di acqua determina un aumento di peso e, come regola generale, io non posso prevedere se la disidratazione sarà seguita da un incremento della concentrazione salina. Per due ragioni:

1. Posso avere dei meccanismi che favoriscono la ritenzione di acqua rispetto a quella di sodio. Ad esempio un eccesso di produzione di *vasopressina* determina ritenzione idrica che determina un aumento di volume e una diluizione di sodio perché di per sè non comporta ritenzione salina quindi un'iposodiemia.
2. Anche in un eccesso di volume i volumi di ripartizione dell'acqua sono differenti rispetto a quelli del sodio: L'acqua si distribuisce in *tutti* i compartimenti, incluso quello intracellulare. Il sodio solo in quello extracellulare.

Cfr slide SODIO E DISIDRATAZIONE pag 17 La concentrazione può variare per:

- perdita di acqua e sodio (diarrea)

- perdita di sodio inferiore a quella dell'acqua(sudorazione) e allora la soluzione extracellulare diventa IPERTONICA

- maggior perdita di sodio invece che di acqua. Per esempio un deficit di aldosterone, per cui la concentrazione salina diventa IPOTONICA, cioè a bassa osmolarità.

La stessa cosa vale per espansione del volume. Posso anche espandere il volume attraverso un meccanismo che faccia trattenere acqua e sodio Oppure con un meccanismo di infusione incongrua di liquidi attraverso una via endovenosa e allora la concentrazione salina rimane la stessa. Posso avere però una condizione di ipotonia, in cui la concentrazione del sodio discende proporzionalmente e il patrimonio salino può rimanere indifferente, oppure addirittura aumentare; se però aumenta di più la quantità di acqua nell'organismo la concentrazione del sodio appare ridotta e questo è come l'esempio precedente di eccesso di produzione di vasopressina. Posso avere infine ipertonicità, come può accadere, anche se raro, per motivi di adattamento funzionale del rene ed è quello che accade in un eccesso di aldosterone, quando la concentrazione del sodio tende ad assumere valori alti o superiori alla media.

àL’altro concetto riassuntivo è che comunque sia l’osmolarità deve essere costante e tutti i sistemi tendono a mantenere in equilibrio la concentrazione di sodio rispetto ai volumi, come vedremo più avanti.

La concentrazione del sodio è mantenuta da *sistemi osmocettoriali*, dal *sistema della sete* e dal *rilascio di vasopressina*, che è un meccanismo di autoregolazione di secrezione di acqua molto sensibile (agisce già a concentrazioni fisiologiche di sodio e legge ogni variazione di concentrazione di sodio già all’interno del range di normalità), è quindi il principale regolatore del bilancio insieme alla sete, favorendo il recupero di acqua.

Ci sono inoltre meccanismi periferici soprattutto a *livello renale* e altri ancora, come *il sistema renina, angiotensina, aldosterone* e infine il rilascio di *peptide natriuretico atriale,* che gioca un ruolo importante nel bilancio (anche se fallimentare nello scompenso cardiaco).

Quindi posso avere condizioni di iposmolarità, determinate da bassa concentrazione salina. In base alla sola concentrazione del sodio, se non ho un parametro che legga la quantità di acqua, non posso definire se la diluizione è l’unica causa dell’abbassamento della sodiemia (= poiché ho tanta acqua e il sodio si diluisce), oppure se ho vera perdita di sodio. L’unico criterio che differenzia una dall’altra è avere conoscenza del reale patrimonio salino, che si può conoscere associando un parametro come il peso corporeo alla concentrazione salina.

Es. Se ho alto peso e basso sodio è probabile che abbia iponatriemia da diluizione.

Se ho una perdita di peso per disidratazione e bassa concentrazione salina il mio patrimonio salino è in assoluto ridotto.

Infine il concetto di osmolarità va tenuto distinto dal concetto di concentrazione del sodio perché ci sono condizioni, e quella che avevamo già visto era il diabete scompensato, in cui l’aumento della glicemia provoca aumento di osmolarità, ma questo non è determinato da alcuna variazione del sodio, ma anzi, questo spesso per l’aumentata concentrazione di glucosio tende a ridursi.

Osmolarità è quasi sempre sinonimo di concentrazione di sodio, ma non è corretto trasferire un concetto nell’altro.

Bisogna tenere in considerazione un fattore principale, la concentrazione secondo la quantità di sodio presente nell’organismo.

Sarà importante come vedrete nella pratica.

Es. se mi arriva un soggetto con normale concentrazione di sodio ed è disidratato, e io ritengo opportuno idratarlo somministrando acqua genererò una iposodiemia da diluizione. Perché non avevo considerato che il patrimonio salino in presenza di perdita di volume, anche se apparentemente per la concentrazione, é sicuramente ridotto in termini assoluti. Quindi una volta che ho corretto la disidratazione determino un’iposodiemia. *Volume, concentrazione Na* e *patrimonio salino* sono tre parametri fondamentali in clinica, variabili che possono muoversi con libertà e di cui dobbiamo avere la percezione quantitativa in ogni momento.

Un breve cenno al sistema dell’ADH La secrezione di ADH è regolata e determinata dal *nucleo sopraottico* e *paraventricolare*. La sintesi avviene poi a livello dell’*ipofisi posteriore* e il rilascio della vasopressina agisce sul *tubulo distale,* dove determina espressione di canali dell’acqua che permettono il rientro dell’acqua dal lume tubulare all’interstizio. La cellula viene attraversata da flussi di acqua e *non* è accompagnato da trasporto salino, è quindi un netto recupero di acqua determinato essenzialmente dalla capacità di rendere elevata la permeabilità cellulare al passaggio acqua.

L’Iposodiemia ha manifestazioni gravi, può accompagnare spesso lo stato di disidratazione, situazione di grave pericolo. In alcuni casi, ora più per diluizione che disidratazione, le componenti plasmatiche si riducono come concentrazione, e quindi ematocrito, azotemia e concentrazione di albumina. Le manifestazioni neurologiche sia da diluizione che perdita netta di sodio sono comunque presenti e legate all’osmolarità e l’alterazione di questa determina anche un’alterazione del riassorbimento gastrointestinale di h2o e con manifestazioni gastrointestinali.

Quando si determina iposodiemia l’entità del danno neurologico è funzione diretta della rapidità con cui avviene il cambio di concentrazione.

A) Se il sodio si abbassa molto rapidamente, ad esempio una perdita idrica corretta erroneamente solo con aqua, con il perseverare nel non recupero di sodio nei giorni successivi, può dare una discesa progressiva di concentrazione di sodio e quando si arriva ad un val ore di 120mmol/l si determina una condizione di rigonfiamento cellulare, perché ho un passaggio netto attraverso le membrane cellulari di acqua che dà un danno cellulare da iposodiemia. Un danno cellulare da diluizione delle componenti osmoticamente attive nelle cellule, quindi rigonfiamento cellulare, è potenzialmente dannoso per i danni neurologici irreversibili che può dare, arrivando perfino alla morte. Per concentrazioni minori a 120 mmol si arriva ad elevata mortalità.

B) Se invece la diluizione del sodio avviene lentamente la cellula è in grado di dismettere soluti e variare la propria concentrazione osmotica intracellulare e adattandosi all'ambiente esterno e determinando un minor danno cellulare. Quindi non sorprende veder ricoverati anziani con concentrazioni di sodio di 115 mmol con però apparente capacità di sopportare l'enorme variazione di osmolarità in maniera inaspettata. Questo Verosimilmente perchè il processo di squilibrio, la perdita di sodio o attraverso l'uso di diuretici o per dieta non adeguata ha fatto perdere sodio ma mantenendo comunque l'assunzione di acqua. Perciò quando avviene lentamente, il danno funzionale cellulare è contenuto.

Ipernatriemia è sempre molto frequente ma proporzionalmente meno dell'iposodiemia, che accompagna molte patologie.(Ad esempio un cirrotico è tendenzialmente iposodiemico, come lo scompensato). L'ipernatriemia richiede una perdita di acqua non corretta, poichè il senso della sete è fortemente spinto dall'aumento della concentrazione del sodio. Perché si abbia ipersodiemia un presupposto è l'alterata percezione della sete, perché questo porterebbe a una correzione immediata. Oppure dev'esserci un'alterazione così massiccia del assorbimento di acqua, per esempio nel caso del diabete insipito nefrogenico, per cui la perdita di acqua è così elevata nelle 24 ore che non è possibile comunque raggiungere un equilibrio.

L'ipernatriemia è quindi abbastanza frequente ma meno dell'iposodiemia e richiede due cose:

1. Perdita eccessiva di h20 così rapida da non poter essere compensata
2. Disequilibrio del sistema dovuto al fatto che l'assunzione idrica è compromessa

Anche qui la velocità con cui si verifica il disturbo è fondamentale. Ad esempio una perdita di acqua da diabete insipido che sorge ad esempio per necrosi delle cellule dell'ipofisi posteriore, che una volta avveniva al termine dei parti protratti per cui la donna andava incontro fenomeno emorragico a livello dell'ipofisi posteriore, che determinava una perdita di capacità delle cellule di rilasciare ormone antidiuretico. Si vedeva una perdita di h20 nei giorni successivi. Oppure traumi con sezione dell' ipofisi, per cui c'era perdita della capacità di produrre o rilasciare ADH, dando una rapida perdita di volume non correggibile, anche cercando di stare alla pari con l'assunzione di acqua.

Bisogna Tenere presente che per ipernatrimia frequenti sono spesso causa l'incapacità di assumere acqua in rapporto ad una relativa capacità di assumere o ingerire sale.

L'Iperosmolarità, quando associata a disidratazione, si manifesta come un quadro di ipovolemia, concentrazione delle cellule nel sangue maggiore, e anche ridotta escrezione urinaria. Tuttavia l'unico aspetto comune a tutte le forme di ipersodiemia è quello della disidratazione intracellulare e le manifestazioni neurologiche. L'ipersodiemia è quindi spesso associata a disidratazione e raramente a iperidratazione, nelle forme più gravi non è infrequente trovare anziani con concentrazioni del sodio superiore di 160mmol/l ed è quasi sempre associato ad uno stato di relativa carenza di volumi.

Le manifestazioni sono quelle neurologiche tipicamente legate al raggrinzimento cellulare.

Una cosa da tener presente, come per le iposodiemie, è che tanto più velocemente si presenta tanto più sono irreversibili i danni. Un incremento rapido della condizione di iposodiemia può di per sè configurare una condizione di relativa ipernatriemia.

Esempio. se un paziente arriva con concentrazioni di sodio di 115mmol, un valore basso, e viene corretto rapidamente e portato a 130, i valori assoluti sono ancora bassi, ma ho determinato una variazione così brusca della concentrazione osmotica che ho generato un danno pari a quello che sarebbe stato causato da un aumento brusco della concentrazione osmolare in termini assoluti.

Va quindi considerata la variazione dell'osmolatarità come entità di variazione indipendente dai valori assoluti. Un soggetto iposodiemico che venga corretto verso l'alto in modo molto brusco subisce un danno, perché la variazione è stata rapida anche se i valori assoluti sono ancora inferiori alla norma.

Infine questa frase "l'ipernatriemia si manifesta quando c'è incapacità di assumere h20".

RISPOSTA INTEGRATA DI VOLUME

Prima di chiudere l'argomento introduciamo un concetto che tratteremo più avanti con lo scompenso cardiaco, ed è la **risposta integrata di volume**. La regola generale è che l'organismo tende a mantenere stabile i volumi e l'equilibrio idrosalino e questo nonostante non ci sia un unico centro di regolazione del volume e dell'equilibrio idrosalino. Come meccanismi di controllo troviamo la sete, l'adh, il rene, e altri ormoni che variano l' attività tubulare, l'angiotensina, l'aldosterone, il peptide natriuretico atriale. Quest'insieme di risposte, pur essendo apparentemente indipendenti e disorganizzate, sono estremamente efficienti nel determinare un riadattamento dell'organismo, che permette in condizioni di disidratazione di recuperare h20 e sale e in caso di iperidratazione di elimiarli. Questo tipo di risposta, che prevede adattamenti funzionali cardiaci, circolatori, regolazione delle funzionalità renali e fenomeni di secrezione ormonale, passa sotto il nome di **risposta integrata di volumi.** Ogni volta che ho una

perdita di volume più o meno associata a perdita di sodio ho un'attivazione di riposta integrata che tenderà a rispristinare lo stato precedente.

Ogni volta che ho un eccesso di volume il sistema viene spento e si perde h20 e sodio. Vedete che è un sistema complesso, c'è la sete, il meccanismo di regolazione intrarenale che rilascia renina e favorisce il recupero di sodio; ci sono fattori legati alla distensione atriale con maggiore o minore rilascio di ormone natriuretico atriale; i meccanismi di regolazione della funzione simpatica quindi l'adattamento cardiocircolatorio e la secrezione di vasopressina che possono regolare sia la secrezione di h20e di sodio.

Se il volume efficace, e cioè quello percepito dai sistemi di regolazione, si riduce l'attivazione complessiva di una serie di risposte integrate permette di recupere il volume.

Abbiamo visto come le variazioni di volumi attivino una serie di meccanismi adattativi, una parte dei quali sono predisposti per dare un adattamento funzionale cardiocircolatorio, questo finalizzato al mantenimento della perfusione degli organi. La principale azione dell'apparato circolatorio è fornire ai tessuti periferici ossigeno e nutrimento attraverso il mantenimento costante del flusso e della pressione sanguigna. Quindi per svolgere la sua funzione di nutrizione costante dei tessuti, il sistema circolatorio (composto dal letto arterioso, venoso e capillare), è in grado di modifica ampiamente la propria funzionalità attraverso variazioni di flusso ematico, determinate da variazioni molto ampie della funzione cardiaca, ma queste sono altrettanto ampiamente regolate attraverso una variazione dei flussi distrettuali.

Quindi i principali determinanti del flusso in periferia saranno: la capacità del cuore di spingere in avanti il sangue, la gittata sistolica, la frequenza cardiaca moltiplicata per il volume di eiezione sistolica:

CO = F = FC X VS

CO= gittata cardiaca

FC=frequenza cardiaca(numero di contrazioni al minuto)

VS=volume di eiezione sistolico(quantità di volume che esce X unità di tempo)

Il sangue viene spinto in avanti e grazie al fatto che la pompa è unica il flusso è identico in ogni sezione dell'albero vascolare, questo fa si che la quantità di sangue che esce dal cuore sia uguale a quella che rientra. Il flusso sanguigno in tutto l'albero circolatorio tende a mantenere le caratteristiche proprie del flusso laminare: in assenza di turbolenze la velocità di scorrimento sui piani sarà maggiore all'interno del lume, mentre all'esterno sarà applicata una maggiore resistenza al flusso, la variazione della velocità di scorrimento è espressione della resistenza che il fluido e le pareti offrono al flusso stesso. *(lo scorrimento all'interno dei vasi avviene per piani paralleli, avviene con scorrimento di strati infinitesimi gli uni sugli altri senza che avvenga alcun tipo di rimescolamento delle particelle del fluido neanche su scala microscopica. In mancanza di turbolenze la velocità di scorrimento sui piani sarà crescente dalla periferia verso il centro poiché all'esterno sarà applicata una maggior resistenza al flusso).*

Questa variazione della velocità di scorrimento è espressione delle resistenze che il fluido e le pareti vascolari stesse offrono.

Il flusso laminare è caratterizzato da:

- *Share rate*=gradiente di velocità tra piani
- *share stress:* la forza che deve essere applicata per far scorrere un piano sull'altro

La velocità di scorrimento dipende inoltre dalle caratteristiche del sangue e della parete vascolare.

Scorrendo in un sistema di conduzione si ha una caduta di potenziale dall' inizio alla fine, che in elettrologia corrisponde alla caduta di pressione.

Possiamo equiparare il sistema circolatorio ad un impianto elettrico caratterizzato da resistenze che determinano una caduta di potenziale.

Nei fluidi indipendentemente dalla sezione, tanto maggiore è la lunghezza del condotto tanto più alta è la caduta di pressione. E' rilevante in quanto struttura vascolare ha una lunghezza propria che determina di per sè l'uscita del sangue dal cuore verso i vasi e quindi i capillari ad un certo grado di caduta pressione. Un 'altra determinante del grado di caduta pressione è la sezione del vaso.

La pressione che si esercita nel circolo è la pressione che è determinata dallo scorrimento in avanti ma anche dalla pressione di riempimento .

La pressione che si esercita nel circolo è determinata dalla spinta in avanti del flusso e da quella pressione che si esercita perpendicolarmente alla parete vascolare, quella che nel parlato noi chiamiamo pressione sanguigna,quella che si esercita sulle pareti, e che noi misuriamo con gli apparecchi di misurazione. Ad esempio ponendo un bracciale che si gonfia, si genera una pressione dall'esterno che supera la pressione di riempimento dei vasi, quella pressione che si esercita all'interno del vaso verso la parete.

Una terza variabile è la pressione data dalla *gravità terreste* a cui siamo tutti soggetti, i liquidi come i solidi. Essendo il sangue un liquido tenderà a disporsi nell' organismo secondo gravità. Se invece che condotti nel nostro organismo avessimo sacche di raccolta del sangue, allora la parte bassa del corpo sarebbe ripiena di sangue e quella alta sarebbe vuota.

Non è indifferente il ruolo della gravità nel determinare differenze di pressione di riempimento dei vasi. Se noi avessimo il collo lungo come quello delle giraffe e un'altezza come quella delle giraffe, non avremmo la capacità di riempire il circolo intracranico poiché non riusciremmo a fornire una pressione adeguata. La forza di gravità impedirebbe la spinta verso l'alto. La giraffa ha una pressione arteriosa anche superiore ai 300mmhg.

Non è trascurabile la forza esercitata dalla gravità terrestre perché cambiando postura noi esponiamo una maggior massa sanguigna all'effetto della pressione gravitazionale, per cui noi tendenzialmente in piedi avremmo un minor riempimento nella parte alta del corpo e maggiore alle gambe, mentre distesi si riequilibrerebbero in flussi.

C'è quindi da tener presente che noi abbiamo solo una misura abitualmente delle variabili che determinano la pressione arteriosa.

Infine la pressione arteriosa è determinata dalla quantità di sangue che viene spinto per ogni atto di contrazione, la quantità di flusso è determinata anche dal numero di contrazioni, ma le proprietà intrinseche della parete vascolare sono altrettanto importanti nel determinare una resistenza al flusso e di conseguenza della pressione di riempimento.

Caso 1: Se il vaso ha un *elevato grado di rigidità* tenderà ad avere minori variazioni di volume (quindi il raggio deve essere costante), e subirà lentamente variazioni di pressione di riempimento. Quindi tenderà a tradurre poco la spinta in avanti del cuore in un flusso costante e manterrà invece il più possibile un flusso peristaltico, cioè in cui si alternano pressioni elevate con altre tendenti allo zero .

Caso 2: Se un invece un vaso è *molto distensibile* si avrà un effetto per cui un'ampia variazione del volume, e quindi del raggio, può attenuare la differenza di pressione .

Quindi un' elevata capacità di distensione vascolare (=compliance) che permette una variazione di raggio e una attenuazione della variazione di pressione, fa sì che la spinta del cuore tendenzialmente da peristaltica (=alternanza di sistole e diastole,ovvero di pieni e di vuoti; pressione alta zero), porti a una pressione più distribuita nelle fasi del ciclo cardiaco.

Questo cambiamento di riempimento non determina di per sé la pressione di riempimento, per la quale serve anche il volume di riempimento, che deve essere associato anche ad un certo grado di resistenza al flusso. Poiché il *flusso è proporzionale al raggio* è importante ricordare che ogni variazione del raggio si traduce in variazione di flusso o di pressione:

- grande raggio significa più sangue nell'unità di tempo

- Un raggio piccolo rappresenta un ostacolo al flusso e comporterà minori flussi.

Anche solo una piccola riduzione del raggio determina un enorme aumento o diminuzione del flusso.

Le determinanti della quantità di sangue che arriva ai tessuti sono:

- la dimensione del raggio (la principale)
- lunghezza vaso àsi abbassa la funzione di riempimento e il flusso tende a ridursi.
- caratteristiche del sangue, se viscoso o fluido. Viscoso flusso minore! Ad esempio pazienti anemici, con poche proteine nel sangue, avranno un flusso sanguigno maggiore. Invece pazienti affetti da mieloma, che producono in modo incontrollato immunoglobuline, o pazienti policitemici, con un enorme numero di globuli rossi, o chi ha assunto epo come eritropoietina come sostanza dopante, avranno un elevato ematocrito, un sangue molto viscoso e quindi un flusso rallentato.

àLa resistenza al flusso è proporzionale a questi ultimi parametri e inversamente proporzionale al raggio

Se vi è una riduzione segmentale del raggio la variazione è a carico della pressione.

Una relazione lega le resistenze vascolari al flusso, alle caratteristiche intrinseche della parete vascolare ed alla viscosità ematica(eq poiseulle)

R=k l Æž/ r4   *F=1/R*

Se io trasformo questa formula al rovescio ho che la resistenza al flusso è proporzionale ai parametri sopra e inversamente al raggio.

<u>Quindi la capacità di far arrivare sangue in periferia dipende dalla modulazione del raggio delle arterie e dalle caratteristiche del sangue.</u>

La relazione che lega il diametro dell'arteria alla pressione spiega poi come si integrino tutti i parametri circolatori.

Se io ho un flusso elevato ho una pressione di riempimento che a parità di condizioni tenderà a essere maggiore. Se riduco il calibro del vaso ho una pressione di riempimento vascolare minore, però cambierà la velocità di scorrimento e cioè l<u>'indice di resistenza</u>.

Es. Se considero la situazione di un tratto vaso costretto e uno dilatato ho una caduta di pressione legata allo scorrimento e un'accelerazione del flusso, questo determina chiaramente una resistenza al flusso e quindi minor capacità di spingere in avanti il sangue.

Considerando la costituzione dell'albero arterioso vediamo che è formato da un sistema di arterie grosse, con alto flusso e bassa resistenza, seguite da arterie più piccole che offrono maggior resistenza al flusso.

La pressione di riempimento è anche funzione della resistenza al flusso dato in periferia, quindi di per sè il riempimento vascolare , il volume e il tono vascolare determinano flussi ma anche pressioni di riempimento. Se ho alta resistenza al flusso in periferia la pressione a monte tenderà ad essere mantenuta a livelli più alti.

Siccome la resistenza al flusso è costante in ogni fase del ciclo cardiaco la pressione di riempimento si determina anche nella diastole.

La capacità di avere un comportamento elastico, di adattare il raggio alle necessità del circolo arterioso è relativamente piccola, ma sufficiente a garantire differenze di flusso e pressione.

Nelle vene l'elevata compliance fa sì che le variazioni di volume avvengano per piccole variazioni di pressione.

Quindi la relativa rigidità del circolo arterioso garantisce volumi e pressioni quasi linearmente correlati, mentre nel circolo venoso l'ampia distensibilità fa sì che le variazioni di volume possano avvenire anche senza grandi variazioni di pressione.

Questo è utile perché il circolo venoso funge un po' da <u>riserva</u> per il sangue, non serve che ci siano variazioni eccessive nella regolazione, perché sono sufficienti le caratteristiche intrinseche del circolo venoso per dare un buon riempimento. Maggiori volumi portano maggiori distensioni senza grandi variazioni di pressione. Al contrario se io opero sui volumi nel circolo arterioso in più o in meno ho variazioni di pressione ampia.

Se esercito una variazione della pressione attraverso una variazione del tono ho una consensuale variazione di flusso.

Ancora un concetto:

-Riguardo la pressione che si esercita all'interno di un vaso, è sì importante quella legata allo scorrimento in avanti del sangue, ma quella più rilevante nel definire la capacità del vaso di mantenere il proprio tono e di fungere quindi da contenitore del flusso sanguigno è la <u>relazione che lega il diametro del vaso con lo spessore della parete</u>. Se il rapporto tra diametro e spessore è positivo, la tensione/ stress di parete (Questa è la tensione che viene esercitata circonferenzialmente sulla parete vascolare) tenderà ad essere molto alta se il raggio è molto grande, ma se aumenta lo spessore della parete lo stress di parete tende a ridursi.

<u>Lo stress di parete è proporzionale alla pressione e al raggio ed inversamente allo spessore di parete</u>

Es. gli esempi sono molto facili: Se voi avete un palloncino riempito d'acqua, se ha una parete sottile avrà elevata distensibilità, si riempirà senza grandi variazioni di pressione, ma all'aumentare del volume aumenterà inevitabilmente anche la pressione, portando alla rottura del palloncino.   Se prendiamo un palloncino con la parete più robusta e lo riempiamo d'acqua ci sarà bisogno di più pressione per distenderne le pareti ma la capacità di sopportare i volumi sarà molto maggiore.

Quindi le caratteristiche del vaso (spessore della parete) sono importanti ai fini della capacità di reggere lo stress di parete e dell'adattamento funzionale ai vari livelli di pressione. Disfunzioni di queste caratteristiche sono presenti in patologie come l'ipertensione arteriosa cioè il cronico aumento dei livelli di pressione.

Dunque ai fini di una corretta circolazione sono fondamentali il ruolo del cuore e le caratteristiche delle arterie, che devono avere un grado ottimale di *distensibilità* ma anche di *contrattilità.* Devono avere una parete che sia robusta in modo da offrire una resistenza al flusso che però non deve essere eccessiva. C'è infine un terzo parametro che riguarda la regolazione dei volumi, nel sistema circolatorio il flusso si mantiene adeguato se adeguati sono i volumi. Poiché il sistema abbia un funzionamento ottimale è fondamentale che i volumi vengano conservati, se ho disidratazione o emorragia la pressione avrà un brusco abbassamento; se ho un' eccessiva ritenzione di acqua da iperaldosteronismo sarà alta.

La relazione è quasi intuitiva e quindi la capacità di spinta in avanti che determina il flusso, la resistenza al flusso e la pressione di riempimento sono le tre determinanti della regolazione della pressione arteriosa ma anche dei flussi e della nutrizione dei tessuti.

Sono tre i parametri su cui si basa la perfusione dei tessuti

- avere un volume ematico adeguato
- resistenza al circolo che devono esserci, e non possono essere assenti. Una brusca vasodilatazione come nello shock anafilattico determina un crollo improvviso della pressione e diminuita perfusione dei tessuti in quanto è assente la pressione di riempimento.
- funzionalità cardiaca sempre adeguata.

In Questo sistema il volume ematico tende ad essere molto costante, i parametri modulabili sono le resistenze vascolari e la gittata cardiaca. Se da fermi si comincia a correre il muscolo deve ricevere molto ossigeno, ci sarà quindi un adattamento del circolo con vasodilatazione, aumento della gittata cardiaca e aumento di pressione che daranno un aumento di flussi distrettuali che possono essere di entità molto elevati e posso arrivare a flussi distrettuali moltiplicati per 10 rispetto al normale.

Avviene così un reindirizzamento del sangue per cui la massa sanguigna che arriva in questo caso ai muscoli aumenta fino a 5 volte. Aumentando i battiti cardiaci e quindi l'output cardiaco è come se avessi una massa sanguigna maggiore .E' comunque un cambiamento in termini relativi, non assoluti. Una parte viene anche dalla vasodilatazione locale, che andrà a discapito degli altri organi vicini, per esempio Se io corro avrò meno sangue a livello intestinale e ad esempio la digestione di qualsiasi alimento sarebbe estremamente difficile.

Quindi il sistema è estremamente integrato e, per il momento teniamo indifferente e costante il valore dei volumi, quindi abbiamo una funzione cardiaca che permette un riempimento molto elevato in sistole. Si generano allora pressioni molto elevate; nel sistema delle canule cardiache, la pressione in diastole è zero perché comincia il riempimento ma, una volta superato il circolo arterioso e le valvole aortiche, si genera una pressione anche diastolica. L'uscita del sangue è determinata dal superamento della pressione di riempimento vascolare, la diastole permette il mantenimento di pressione perché non c'è flusso retrogrado e c'è una resistenza al flusso che si origina in questa porzione del circolo .

Inoltre nella porzione iniziale della circolazione l'elevata distensibilità dell'aorta permette un' attenuazione delle variazioni di pressione. Avremo in correlazione alla lunghezza del segmento vascolare una riduzione di pressione in funzione della riduzione del calibro e una riduzione della pressione, un aumento delle resistenze vascolari perché con la riduzione del calibro vascolare e si genera una pressione diastolica a monte data dall'*effetto glicastle* (? spelling incerto) a livello delle arterie di grosso calibro e una resistenza al flusso nelle arterie di calibro minore.

Le arterie di grosso calibro di conduzione sono, per alcuni aspetti, simili all'aorta poiché hanno un effetto di attenuazione legato alla maggiore compliance. Via via che si riduce il calibro l'arteria aumenta lo strato muscolare, lo spessore di parete diventa maggiore e il rapporto raggio parete tende ad essere a favore dell'ultimo. Si vedrà quindi una maggior resistenza al flusso e, poiché la parete è costituita da fibre muscolari per quanto non molto organizzate, c'è una capacità di *modulare* la resistenza attraverso un maggiore o minore stato di contrazione .

Rif a figura pag 87 slide, la porzione segnata in giallo è un segmento del circolo arterioso che è in grado di giocare sui flussi a valle attraverso un minore o maggiore calibro e sulle resistenze a monte ancora una volta in senso inverso. Se ho una vasocostrizione nel punto indicato dalla freccia la pressione salirà molto e si ridurranno i flussi, se vasodilato la pressione scende, a parità di funzione cardiaca, aumentano i flussi a valle .

Un altro aspetto (riferito a disegno) è che l'ampiezza del differenziale sistole-diastole delle pressione tende ad attenuarsi. Non solo la pressione si riduce ma soprattutto lo fa il differenziale. Il risultato è a livello delle arteriole con calibro inferiore a 50 micron e nei capillari dove il flusso è costante ed indipendente dalla relazione a livello cardiaco che c'è tra fase sistolica e diastolica.

Il flusso tende a rimanere costante perché nelle varie fasi del ciclo cardiaco il flusso tende ad avere pressioni quindi volumi più bassi fino al circolo capillare dove, la caduta di pressione data dallo scorrimento in funzione alla lunghezza del vaso, determina

poi il passaggio da un sistema a bassissime pressioni, come il venoso con vasi con grande compliance. *Nel sistema venoso grazie alla compliance variazioni consistenti di volumi non determinano alcuna variazione delle pressioni di riempimento (fino al ventricolo destro).*

L' altro aspetto caratteristico è che se confrontiamo i volumi di rendimento del circolo arterioso,capillare e venoso vediamo che sono enormemente diversi. Se ricordate la relazione iniziale ogni sezione ha lo stesso flusso, e nella periferia è minore perché ce n'è meno ed è più lento. Ho dunque alta capacità, bassa pressione e quindi bassa velocità di scorrimento. Alte pressioni comportano bassi volumi e bassa velocità di scorrimento.

L'aorta ha la funzione di permettere il passaggio del sangue nei diversi organi ed ha in sè una grande distensibilità, ogni fase sistolica si accompagna a una distensione dell'aorta. Il polso aortico e cioè la distensione aortica è facilmente apprezzabile al giugulo. Cosa permette questo? --Permette nella fase sistolica di avere un' attenuazione della pressione, mentre in diastole, poiché siamo in presenza di una struttura di tipo elastico, riscontriamo tutte le caratteristiche del modulo elastico. Il che significa, la capacità di determinare un ritorno della parete. Le caratteristiche del modulo elastico di pressione sono determinate dal fatto che la parete sia formata meno da cellule muscolari e in maggioranza da elastina e collagene con quindi duplice effetto. Riscontriamo un' attenuazione in sistole e ritorno elastico che favorisce la spinta in avanti. Arrivati alla biforcazione si genera un'onda di ritorno, l'onda riflessa. Questa è inevitabilmente generata dal fatto che la sezione del vaso si riduce.

Un'aorta molto elastica avrà un circolo che tenderà ad essere più lento in avanti e un'onda di ritorno relativamente più tarda e piccola. Quindi una classica onda di polso sarà caratterizzata da un'ampiezza in sistole e da un'attenuazione a base ampia con una comparsa tardiva dell'onda riflessa. Se un vaso è molto rigido (come nell'aterosclerosi dove la parete spesso calcifica, cambiando la struttura della parete che diventa rigida) troviamo una compliance ridotta e un'aumentata stiffness (rigidità).

Se un vaso è elastico nel tempo di transito, cioè la velocità di flusso dell'onda, avrà un flusso rallentato. Se la parete è più rigida aumenta la velocità di scorrimento, il sangue viene spinto più rapidamente in avanti e quindi accelera l'onda riflessa.

Cfr Pag 89 diagramma di un'onda in aorta, un' tempo aorta rigida avrà maggior ampiezza, la base dell'onda è molto piccola e accelera la comparsa dell'onda riflessa, finché non giunge a sovrapporsi all'onda primaria sistolica, il che determina un aumento generale dell'onda primaria. Avrò un polso (ampiezza sistole diastole) molto più alto, e genero in sistole una pressione molto più elevata.

Se aumenta la pressione sul vaso aumenta lo stress di parete (dato da pressione e dal raggio e inversamente proporzionale allo spessore della parete), se lo spessore non cambia, non avendo l'aorta fibre muscolari, un'aorta che subisca in sistole una pressione più elevata va incontro a rimodellamento strutturale negativo che va ad ampliare il raggio perché la parete non regge lo stress. Come il palloncino di prima, la distensione è proporzionale alla pressione di riempimento del volume finché lo stress di parete non diventa insostenibile. È possibile questo nell'aorta come è anche molto frequente la dilatazione dell'aorta in virtù dell'alto stress di parete; avrete sentito parlare di aneurismi dell'aorta e infatti questi sono posti nella porzioni Più distali dove si genera l'onda riflessa e L'onda di polso tende ad essere più ampia.

Quindi una parete arteriosa rigida determina

- pressione sistolica aumentata
- elevato differenziale sistolico e diastolico
- un elevato stress di parete.

Le modificazioni sopra elencate sono applicabili anche alle nostre arterie di conduzione

Elevata rigidità determina maggiore ampiezza dell'onda, accelerazione dell'onda riflessa e aumento differenziale sistole-diastolico.

Che ruolo hanno i vasi periferici nel regolare la pressione? Quando si è generata l'onda riflessa il sangue procede e la morfologia dell'onda non varia molto, ma essendo in riduzione il diametro dei vasi, cambia l'*ampiezza* complessiva (=L'onda si miniaturizza), ma tende a mantenere la stessa struttura, non si modifica ulteriormente. In quanto le variazioni successive più che determinate dall'elasticità dipendono dalla componente muscolare delle arterie più piccole. Quello che cambia nelle porzioni distali (al contrario delle grosse arterie dove l'elasticità determina morfologia dell'onda), che verso i tessuti, è la regolazione dei flussi e delle pressioni data dal tono arteriolare.

La morfologia dell'onda, una volta generata un'onda riflessa e una primaria, rimane uguale e si trasmette in periferia con variazioni molto piccole, tanto che gli strumenti che si usano per studiare la morfologia dell'onda vanno a rilevarla in periferia per poi ricostruire con sistemi di trasformazione l'onda originaria in aorta

Quello che cambia è il lume del vaso e la capacità di modulare il diametro del raggio. Interviene quindi nel circolo periferico una seconda determinante della pressione arteriosa cioè le resistenze al flusso.

Le resistenze al flusso sono estremamente variabili. Abbiamo fatto l'esempio della corsa, voi siete fermi e cominciate a correre. Nel correre abbiamo una ridistribuzione dei flussi, un' aumento della gittata cardiaca e nel muscolo striato aumenta l'irrorazione in modo quasi istantaneo. Non c'è una latenza tra l'inizio della corsa e un flusso distrettuale maggiore. Vuol dire che il sistema cardiocircolatorio periferico avverte la variazione del flusso e si adatta . Per avvenire così velocemente devono esserci o meccanismi centrali estremamente efficienti o meccanismi locali, in realtà sono entrambi ma questi ultimi sono quelli che prevalgono.

Vedremo il ruolo sistema nervoso simpatico nel regolare il tono vascolare.

Facciamo ora un esempio che vale anche per la distensibilità vascolare.

Es.Se voi arrestate il flusso sanguigno mettendo un manicotto attorno all' avambraccio di un paziente e lo tenete gonfio per 5 minuti, avete un completo arresto del flusso a valle. Rilasciato il manicotto la quantità di sangue che entra nel circolo dell'avambraccio è maggiore di quello che ci sarebbe stato in condizioni fisiologiche prima dell'ischemia. E' il fenomeno della riperfusione che è molto rapido e avviene *localmente* e non infatti nell'altro braccio. E' difficile pensare quindi che ci sia un controllo centrale che diriga il flusso in modo così differenziato. Devo immaginare ci sia un meccanismo locale dipendente ad esempio da sostanze prodotte localmente che vasodilatano. Ma se io vado a studiare il circolo a monte del tratto ischemizzato, trovo che anche lì è dilatato e sta a significare *che il flusso stesso incrementandosi determina localmente una vasodilatazione*. Ci sarà un mediatore tra cui il principale è L'ossido nitrico ,ma deve esserci anche un meccanismo di trasduzione locale che permette di rilevare lo stiramento della parete e che lo traduca in una vasodilatazione.

Le cellule che leggono il fenomeno non sono barocettori ma cellule endoteliali con un sistema di trasduzione del segnale meccanico e di tipo biochimico. Se io elimino le cellule endoteliali in un animale da esperimento l'arteria non si dilata.

Quindi i fenomeni sono del tutto locali ma determinati da una serie di trasduzione che diventa da meccanica a biochimica, da recettoriale a segnale biochimico. Se rilascio vasodilatatori localmente, come fa anche l' ischemia stessa,avrò localmente vasodilatazione perché i mediatori danno rilassamento muscolare. Quindi i fenomeni di regolazione vascolare sono locali, hanno spiegazioni diverse ma vie finali che son sempre le stesse. Questo meccanismo di adattamento vascolare immediato è estremamente sofisticato perché permette di adattare alla necessità funzionale il tono vascolare in un distretto e non in un altro. Se voi mangiate ci sono sostanze rilasciate dalla parete intestinale, ormoni intestinali, che aumentano il flusso sanguigno agendo sul tono vascolare, non aumenta nel muscolo.

L'azione è originata da un recettore che induce una cascata che porta al rilascio/sintesi di composti vasoattivi. Abbiamo quindi un primo mediatore e un secondo mediatore intercellulare che può essere come quasi sempre essere sintetizzato direttamente nelle cellule endoteliali .Questo mediatore funge da regolatore complessivo del tono vascolare. Questo concetto è più che ventennale ed è ancora alla base per la comprensione della capacità del circolo di autoregolarsi in questo modo. Se c'è un alterazione del sistema il risultato sarà un'alterazione persistente della capacità di autoregolazione.

Ad esempio mettendo il manicotto per la misurazione della pressione ad un paziente dopo che abbia fumato 5 sigarette e faccio la prova, vedo che dopo 5 minuti di ischemia dell'avambraccio non c'è nessuna vasodilatazione, il flusso è uguale a quello basale, nessun incremento di flusso. I tessuti non vengono così nutriti rapidamente, questo perchè nel fumo ci sono sostanze che impediscono alle cellule endoteliali o di sintetizzare o di rilasciare una forma biologicamente attiva di ossido nitrico. I composti ad attività perossidante possono ossidare l'no e trasformarlo in perossinitrito che non è più biologicamente attivo. Dopo alcune ora che non il paziente non fumato,se ripeto la prova, l'arteria si dilata quindi queste risposte sono funzionali, non c'è un vero e proprio danno anatomico, come poteva sembrare all'inizio, ma può esserci un grave impedimento.

Se io facci lo stesso dopo un pasto ricco di grassi ottengo lo stesso effetto. Anche cominciare a correre dopo un pasto ricco di grassi, causerà una prestazione muscolare peggiore. Un po' perché il flusso è diretto all'intestino e un po'perché il tono vascolare non è modulabile perché quelle arterie subiscono gli effetti di sostanze generate nella digestione che alterano le capacità dell'endotelio impedendo la produzione di composti vasodilatanti. La regolazione dei flussi e delle pressione avviene si per azione dell' sistema nervoso centrale ma anche localmente dove pesa l'attività dell'endotelio. A livello intermedio ci sono quegli adattamenti che possono esserci, indirizzamento di sangue tra organi, sistema complesso che richiede spesso la secrezione di ormoni e poi fenomeni adattativi del circolo capillare. infine la regolazione dei flussi e delle pressioni avviene a lungo termine perché vengono regolati i volumi e qui gioca il un ruolo importantissimo il rene. Se questo riesce a stare in pari alla quantità di acqua e sodio che vengono introdotte, ho un bilancio; ma se ho un rene che normalmente fa trattenere una mole di sodio dà un cambiamento di volume che avrà come conseguenza ovviamente un aumento del volume ematico, il sodio resta nel comparto intracellulare e così si alza la pressione.

Ho 3 meccanismi che intervengono sulla pressione, uno che si instaura istantaneamente, uno che si prolunga nel tempo e ridirige i flussi e un terzo che è una regolazione a lungo termine data dalla capacità del rene di mantenere costanti pressioni e flussi attraverso una regolazione del patrimonio idrico e salino.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 17/12/2012

Lezione di Patologia del 17/12/12

Professore: Cassatella

Sbobinatore: Zancan Giovanni

NEUTROFILI ED INTERAZIONI CELLULARI

I neutrofili sono sempre state considerate cellule in grado di essere esclusivamente reclutate rapidamente durante l'infiammazione, in quanto sono cellule che producono quantità elevate di sostanze pirogene e con un'alta capacità di fagocitare microrganismi e particelle causanti infezione. Tutto ciò legato al concetto che queste cellule avessero una vita molto breve e fossero incapaci di sintetizzare proteine(dogma rimasto fino a 10 anni fa circa).

In realtà queste cellule possono sopravvivere molto più a lungo rispetto a quanto si credesse, sia in circolo sia una volta migrati nei tessuti. In effetti i neutrofili possono essere considerati cellule plastiche capaci di rispondere alle sostanze presenti nell'ambiente, ad esempio possono rispondere alle citochine. La risposta avviene direttamente in quanto le citochine possono stimolare le funzioni di queste cellule oppure possono rispondere secondo il concetto dell'**attivazione** ossia cambiare lo stato funzionale e le proprie capacità effettrici.

Ad esempio può essere aumentata:

- la capacità di produrre e rilasciare enzimi a livello extracellulare
- la capacità di fagocitare dei neutrofili da parte di una citochina che stimola l'espressione di un recettore in grado di riconoscere le opsonine(**fc|□♣ receptor**) o conun aumento ex novo di altri recettori che riconoscono la porzione fc che lega un microrganismo.

Meccanismi di attivazione dei neutrofili

L'attivazione è un processo che richiede tempo. Si pensi che l'attivazione da citochine o altre sostanze, molto spesso richiede la biosintesi proteica ex novo della molecola in questione. I neutrofili, nonostante terminali e pur avendo basso numero di mitocondri, possono comunque sintetizzare proteine. Un ambiente ricco di sostanze, come **l'ambiente pro infiammatorio** ricco di citochine e agonisti, fa si che i neutrofili potenzino la loro azione.

Inoltre molto spesso queste varie sostanze sono in grado(oltre che a provvedere all'attivazione delle cellule) di **allungare la sopravvivenza** dei neutrofili stessi ed anziché morire in poche ore sono mantenuti in vita fino a 3/4 giorni. Tutto questo per ribadire che i neutrofili sono in realtà cellule plastiche e possono subire l'effetto dell'ambiente vivendo molto di più ed agendo in maniera molto più efficace eliminando l'agente eziologico d'infiammazione.

Meccanismi molecolari dipendenti da citochine per inibizione dell'apoptosi

Trattiamo ora i meccanismi molecolari per inibire l'apoptosi costitutiva di queste cellule con le implicazioni patologiche che vi possono essere.

Nell'**artrite reumatoide,** patologia infiammatoria cronica delle articolazioni, prelevando l'essudato contenente neutrofili e seminando poi questi su di un terreno di coltura si apprezzerà che questi possono sopravvivere per diversi giorni.

Se si esegue la stessa procedura con i neutrofili del sangue si vedrà che i neutrofili muoiono in poche ore nonostante siano capaci di produrre nuove proteine comprese citochine, recettori e proteine dei granuli. Questo significa che vi è un ambiente che mantiene la vitalità di queste cellule. Ogni stimolo ricevuto induce un pattern specifico di risposta da parte di queste cellule determinando una diversa produzione di citochine.

Va evidenziato che possono venir prodotte anche citochine che sono in grado di **inibire** questa aumentata funzionalità e diminuire l'emivita dei neutrofili come ad esempio IL4 e TGF|□′.

Produzione citochine da parte dei neutrofili

(vedi slide neutrofili-citochine)

I neutrofili denotano un enorme potenzialità per quanto riguarda la produzione di citochine appartenenti a svariati gruppi. Come ci si aspetterebbe, essendo cellule dell'infiammazione acuta, possono produrre **chemochine** e **citochine infiammatorie** ma sorprendentemente possono sintetizzare anche **citochine antinfiammatorie**.

Possono anche essere citochine **immunomodulatorie**. E' questo uno degli aspetti che lega l'immunità innata all'immunità specifica.

In più sintetizzano anche **fattori di crescita** che agiscono a livello del midollo osseo e che ad esempio vanno ad indurre la produzione di nuove cellule. Oltre a questo anche **citochine della famiglia del TNF** ed addirittura sostanze che favoriscono l'**angiogenesi** o la **fibrogenesi**.

Queste funzioni fanno capire che queste cellule sono molto importanti anche dal punto di vista patogenetico in quanto possono essere implicate in diversi processi fisiopatologici.

Si ricordi che comunque la capacità biosintetica di queste cellule è molto bassa rispetto ai linfociti, ai monociti e alle cellule dendritiche. Compensano questo fatto essendo in numero molto maggiore rispetto agli altri tipi cellulari in un ambiente come quello della flogosi dove per l'appunto vi sono moltissimi neutrofili. Anche una bassissima produzione di una citochina "x" aumenta di molto la concentrazione nell'ambiente.

Produzione di chemochine

Tra le citochine che i neutrofili producono vi sono anche le **chemochine**. Ancora una volta la produzione è molto regolata. A seconda dello stimolo c'è un pattern biologico ben preciso.

La funzione importante è che queste cellule, sulla base della loro capacità di produrre chemochine, sono in grado di **reclutare** i diversi tipi di leucociti.

Questo ci fa intuire che sono molto importanti per orchestrare le fasi successive della risposta in quanto vanno a produrre chemochine che attraggono cellule che saranno importanti per quella determinata infezione. Gli stessi neutrofili sono fortissimi produttori di **CXCL8** che è uno dei più potenti chemioattrattori dei neutrofili stessi.

Neutrofili e fenomeno del cross-talk(cellule dendritiche)

La capacità dei neutrofili di produrre chemochine, citochine, **defensine**(anche quest'ultime hanno la capacità di attrarre i leucociti) in recenti studi ha fatto pensare che ci fosse un **cross-talk** tra i neutrofili e i vari leucociti (i cross-talk sono a tutt'oggi molto studiati).

Oramai è noto che una cellula da sola ha un'azione limitata ed ha bisogno di interagire con l'ambiente ma soprattutto necessita della stimolazione e dell'incontro da parte di altri leucociti per verificare se anche i neutrofili possono interagire con le altre cellule.

Si è visto tramite studi in vitro, sul topo e nell’uomo, che i neutrofili possono interagire con le **cellule dendritiche** in maniera reciproca. Inoltre è oramai assodato che i neutrofili possono produrre citochine e chemochine che in seguito ad adeguato stimolo come ad esempio in seguito a infezione da funghi possono reclutare le **cellule dendritiche immature**, interagire con queste e in maniera contatto dipendente favorire la **maturazione** delle stesse.

Si ricordi che le cellule dendritiche immature e nel momento in cui incontrino una sostanza appropriata maturano aumentando l’espressione di MHCII. Vanno poi ad interagire con i linfociti T naive.

La cellula dendritica matura comincia a produrre citochine come IL12 e TNF che influenzano la **polarizzazione** della risposta immunitaria specifica(in questo caso possono favorire la risposta th1).

E’ importante tener presente che le cellule dendritiche sono molto importanti in quanto presentano l’antigene al linfocita t naive. La presentazione stessa dell’antigene da parte di una cellula dendritica che è stata attivata da antigeni ben precisi fa si che queste cellule a loro volta diventino in grado di stimolare i linfociti T e di favorire la polarizzazione dei linfociti t naive.

La polarizzazione dipende dall’ambiente in cui la stimolazione avviene il quale a sua volta è determinato dallo stimolo che ha agito. A seconda dall’agente eziologico queste cellule dendritiche sono in grado di interpretare l’informazione e indurre la produzione di molecole stimolatorie che inducono la produzione di citochine:

- IL23 nel caso dei th17
- IL12 ed IL27 IF⎸□ϒ nel caso dei th1
- IL10 e TGF⎸□′ nel caso dei th2

In questo ambiente si determina una risposta immunitaria specifica che determina la polarizzazione dei linfociti. Quindi le cellule dendritiche sono molto importanti come:

1. Promotrici della risposta immunitaria specifica
2. Cellule che fanno da ponte tra l’immunità innata e l’immunità specifica.

Tipologie e funzioni delle cellule dendritiche

Esistono numerose tipologie di cellule dendritiche. Nel sangue si riconoscono due diverse sottopopolazioni principali di cellule dendritiche:

- **Conventional DC** che a loro volta includono altri tre sottotipi
- **Cellule dentriche plasmacitoide**.

Ciascuna di queste popolazioni si riconosce per vari marcatori, per fenotipo e pattern di citochine.

Per quanto riguarda le **cellule plasmacitoidi**, esse sono fondamentali in quanto durante un’infezione virale producono grandi quantità di IF⎸□ϒ rispetto alle altre popolazione in grado di produrre IF⎸□ϒ stesso(IF⎸□ϒ è fondamentale per l’attivazione delle difese innate contro i virus).

La loro produzione di IF⎸□ϒ è consentita grazie all’espressione di una serie di recettori specifici.

Sono queste le funzioni che si conoscono con un certa chiarezza riguardo alle cellule dendritiche del sangue.

S’inizia ora a riconoscere quali sono le cellule dendritiche che migrano nei tessuti o negli organi linfoidi e quali sono quelle di cui le cellule del sangue sarebbero precursori.

Le informazioni finora citate si riferiscono soprattutto ai neutrofili che reagiscono con le conventional DCs.

Cross-talk plasmacitoidi/neutrofili e lupus eritematoso sistemico

Le cellule dendritiche per la gran parte sono cellule di origine **mieloide** e non linfoide come si pensava fino a pochi anni fa.

Solamente due anni orsono è stato scoperto un cross-talk molto importante che interviene nel **Lupus eritematoso sistemico**, patologia autoimmune diffusa che notoriamente coinvolge le cellule plasmacitoidi. In questa patologia infatti si producono in maniera poco regolata quantità elevate di IF1. Questo assieme ad altri meccanismi patogenetici è molto importante per la progressione di questa patologia.

Si è scoperto che i neutrofili possono contribuire alla patogenesi di questa malattia in quanto sarebbero in grado di amplificare la produzione di IF1 da parte delle cellule plasmacitoidi. Questo grazie al fatto che queste cellule se necessario rilasciano i **NET**(**neutrophil extracellular trap**). Questi NET i quali consistono in reti di cromatina alla quali sono agganciate numerose proteine contenute nei granuli dei neutrofili andrebbero a stimolare direttamente(visto che le cellule plasmacitoidi hanno dei recettori che riconosco il DNA) la produzione di IF1. Quest'ultimo a sua volta provocherebbe la formazione di NET da parte dei neutrofili in una sorta di circuito NET-IF1 che amplifica questi fenomeni.

Inoltre questi NET proprio per il fatto che espongono una grande varietà di proteine e DNA andrebbero a stimolare anche i linfociti B. I linfociti B sono responsabili della produzione di **autoanticorpi**(contro il self) che sono dei marcatori specifici di questa malattia.

Neutrofili e produzione dei NET

La storia dei NET nasce da un lavoro pubblicato su Science nel 2004 in cui alcuni ricercatori hanno scoperto che quando i neutrofili sono massivamente attivati in condizioni estreme in cui vi possono essere infezioni oppure sostanze attivanti i neutrofili in maniera drammatica, questi possono morire in una maniera molto particolare che determina il rilascio delle proteine contenute nei granuli e della cromatina. Queste molecole secondo quanto si sarebbe osservato recentemente rimarrebbero intrappolate nei NET.

L'idea riguardo alla funzione dei NET è che questi servano ad intrappolare i batteri e a ucciderli grazie alla presenza delle proteine dei granuli(elastasi e tutte le altre).

Rappresenterebbe una nuova modalità dei neutrofili di uccidere i batteri a livello extracellulare senza la necessità di fagocitare le cellule.

Inoltre sembra che anche la presenza di immunocomplessi andrebbe a stimolare questa nettosi.

(Seguono slide con vari esempi)

Meccanismi di formazione dei NET

Sembrano essere coinvolti sia meccanismi di **signaling** che la produzione di radicali liberi da parte della **NADPH ossidasi** che gioca un ruolo nella cascata della formazione dei NET. Questa teoria è confermata basandosi su pazienti affetti da **CGD**(Chronical Granulomatose Disease) in cui sembra non si formino i NET ribadendo l'importanza dell'NADPH ossidasi e dei radicali.

Vi sono infine una serie di eventi coinvolti nella formazione dei NET che possono essere così riassunti:

- produzione di radicali liberi dell'ossigeno
- rottura dei granuli
- rottura della membrana nucleare
- de condensazione della cromatina e rilascio con formazione dei NET

I NET sono apprezzabili al microscopio confocale o all'esame microscopico per fluorescenza con anticorpi contro la cromatina, gli istoni, DNA, o l' elastasi(utili per dimostrare la co-locazione di DNA ed elastasi).

(Varie slide al riguardo)

Sono molti i microganismi in grado di indurre rilascio di NET. Vari esempi possono essere Stafilococco, Shigella, batteri Gram +, Gram – e micobatteri. Tutti verificati con studi fatti mediante esperimenti in vitro nel topo. Attualmente stanno uscendo studi fatti anche sull'uomo. In uno di questi sarebbe emerso che anche HIV sarebbe in grado di indurre rilascio di NET da parte dei neutrofili che intrappolano HIV eliminandolo.

La lista di proteine che si possono misurare nei NET si sta allungando, con elastasi, istoni, fattori di trascrizione, **allarmine**(sostanze intracellulari che quando la cellula muore può rilasciare e producono potentissimi effetti pro-infiammatori), ⎪□ϒ-defensine.

Gran parte sono enzimi prodotti dai neutrofili che possono direttamente uccidere i batteri intrappolati (altre slide al microscopio a scansione con bacilli, cocchi intrappolati nelle NET).

Domanda: "La Nettosi è una soluzione applicata in extremis dai neutrofili?"

Tutti questi studi son in gran parte effettuati in vitro ma ancora non esiste una dimostrazione chiara che veramente questi NET servano per uccidere questi patogeni(Vi sono infatti molti scettici). Non è ancora chiaro quando e se si formino i NET in vivo.

E' stata fatta un'ipotesi di tipo temporale. Si ricordi che la fagocitosi è un processo che avviene in maniera rapidissima e che induce la degranulazione che può avviare l'uccisione di batteri intracellulari o anche extracellulari. Come soluzione estrema, quando i neutrofili sono molto attivati(ad esempio durante un'imponente infezione batterica) vengono stimolati a produrre NET. Deve però essere ancora accertata questa ipotesi ma in ogni caso è da tener presente questa nuova strategia dei neutrofili per uccidere i patogeni.

Domanda: la presenza di DNA extracellulare non potrebbe causare un ulteriore attivazione?

Certamente, infatti ad esempio nel caso precedente delle plasmacitoidi, questo DNA attiva le plasmacitoidi perché va a stimolare proprio la produzione di IF⎪□ϒ o altro. E' quindi un'altra possibile funzione dei NET non legata all'uccisione dei batteri ma alla capacità del DNA libero di stimolare le altre cellule.(diapositiva riassuntiva al riguardo)

Neutrofili e fenomeno del cross-talk(cellule Nk)

I neutrofili possono anche interagire con le cellule Nk con un cross talk di tipo bidirezionale. Le Nk sono cellule dell'immunità innata che sono potentemente attivate da una serie di citochine(in particolare IL2, IL15, IL18) che potenziano la funzione delle cellule Nk stesse. Non solo ma le inducono a produrre una serie di citochine tra cui IF⎪□♣ e TNF che possono agire anche sui neutrofili, sia citochine che stimolano attivazione ma anche citochine in grado di aumentare la sopravvivenza.

In realtà le stesse cellule Nk potrebbero interagire direttamente con i neutrofili. Quando ciò accade spesso a contatto anche con altre cellule questo può invece risultare invece in un **killing noto**. Avviene ad esempio tra cellule Nk e dendritiche e serve per terminare l'azione delle cellule dendritiche.

Questo evento può avvenire anche nei confronti dei neutrofili. In particolare le cellule dendritiche da una parte attraverso fattori solubili possono favorire la vitalità dei neutrofili mentre attraverso il contatto possono ucciderli.

Cellule Nk e neutropenia

Recentemente un gruppo francese ha effettuato uno studio sia su modello knock-out murino mimando esattamente la patologia umana sia su pazienti umani.

I ricercatori osservarono che nei soggetti affetti da **neutropenia**, ossia diminuito numero dei neutrofili, vi sarebbe anche un difetto di maturazione e funzionalità delle cellule NK. Ciò significa che omeostaticamente i neutrofili sono importanti sia nei processi di maturazione (soprattutto nelle ultime fasi nel midollo delle Nk) che nel mantenimento della funzionalità delle cellule Nk.

Vi è perciò un rapporto reciproco tra neutrofili e cellule Nk secondo questo studio che comunque dev'essere ancora confermato.

Neutrofili e fenomeno del cross-talk(linfociti B)

I neutrofili possono anche interagire con le cellule dell'immunità specifica come i linfociti B in quanto vi sono dimostrazioni che queste cellule sono in grado di produrre chemochine ed abbondanti citochine appartenti alla famiglia dei TNF, che sono molto importanti in quanto agiscono in diversi processi non solo nell'ambito dell'immunità innata. Queste citochine sono **April** e **Blys**. Queste sono in grado di mantenere la sopravvivenza dei linfociti B maturi, favoriscono la maturazione delle plasmacellule e contribuiscono alla produzione di immunoglobuline. Da pochi anni è stato chiarito anche un loro ruolo in varie malattie croniche e nei tumori. A tal proposito sono stati introdotti farmaci in grado di bloccare queste molecole.

L'anno scorso con uno studio molto sorprendente, è stato chiarito un altro potenziale significato di interazione tra neutrofili e linfociti B.

In questo lavoro si dimostra, sia nell'uomo che nel topo, che esiste un pool di neutrofili della milza che vanno a localizzarsi nella zona marginale della stessa. Inoltre è stato dimostrato che è attraverso la produzione di **BAFF** e **April** che sono in grado di stimolare i linfociti B localizzati in questa sede.

Questi linfociti B sono specializzati a produrre **anticorpi naturali** nel senso di prodotti in assenza di linfociti T(Tcell indipendent production of antibody). I neutrofili aiuterebbero i linfociti B a produrre queste immunoglobuline che avrebbero significato di protezione durante la risposta infiammatoria naturale e precoce per dare il tempo di produrre gli anticorpi specifici Tcell-dependent.

Neutrofili e fenomeno del cross-talk(linfociti T)

Vi sono studi che denotano presenza di interazione tra neutrofili e linfociti Tnaive CD4+ e CD8+, così come ci sono studi che riguardano linfociti T polarizzati(th17,th1,th2,treg).

Ancora una volta ci può essere un cross talk bidirezionale, in cui quello che succede è che i neutrofili, attraverso la produzione di chemochine, possono reclutare le varie popolazioni di linfociti T.

D'altro canto, i linfociti T attraverso la produzione di loro citochine possono attivare e mantenere i neutrofili.

Capacità reciproca di influenzare le proprio funzioni in maniera positiva => Cross-talk che amplifica le risposte

Azione immunosoppressoria dei neutrofili

Esiste una serie di osservazioni che dimostra che i neutrofili, attraverso il rilascio di alcuni mediatori come per es. l'ossido nitrico o l' arginasi, avrebbero la capacità di sopprimere la risposta dei linfociti T, in modo particolare la loro proliferazione e attivazione; pertanto un' **azione immunosoppressoria**, specifica di certe situazioni, **da parte dei neutrofili sui linfociti T** (osservazione supportata da studi in vitro e in vivo su animali). Ciò ha fatto pensare a un' altra faccia dei neutrofili, portandoli a essere considerati come **MDSC**, "**M**yeloid **D**erived **S**uppressor **C**ells" , ossia "cellule di derivazione mieloide" capaci di sopprimere potentemente le risposte immunitarie, non solo perchè agiscono sui linfociti T, bensì anche perché agiscono anche su altre cellule bersaglio, sopprimendo la reazione immunitaria. Queste cellule bloccano i linfociti CD8+ e CD4+, attivano IL-10, inibiscono le cellule NK e le cellule dendritiche, aumentano la produzione di Treg. Sono cellule molto studiate nei topi e in pazienti con tumore. I modelli murini sono molto conosciuti, meno studi invece sono stati fatti nell'uomo. Nei modelli murini si è evidenziato che dove

vengono trapiantati o indotti tumori, si sviluppano due linee di tali cellule: la linea **monocitaria** e la linea **granulocitaria**. Sono cellule che derivano da un precursore del midollo che matura fino a un certo punto e poi entra in circolo. Si ritengono essere cellule al penultimo stadio di maturazione, e la produzione di queste cellule sarebbe indotta da fattori tumorali, come IL-6. Un' altissima produzione da parte del tumore di queste citochine andrebbe ad agire sul midollo facendo si che vengano immesse in circolo.

Il concetto è che **i neutrofili, con la loro capacità di produrre sostanze che possono immunosopprimere i linfociti T, si espandono nei pazienti con tumori e quindi giocano un ruolo nella immunosoppressione**, la quale si rileva soprattutto nelle fasi avanzate di pazienti tumorali. Le MDSC non solo si sviluppano nei pazienti portatori di tumori ma anche in quelli con infiammazione e infezioni croniche, tubercolosi, sepsi, pazienti traumatizzati. In questi casi i pazienti sono fortemente immunosoppressi e ciò si correla con la presenza di tali cellule.

Ruolo dei neutrofili nei tumori

Il ruolo dei neutrofili nei confronti di tumori è **duplice**: **pro-tumorale** o **anti-tumorale**. Questo è un discorso che vale anche per macrofagi e **….?....** Una funzione dei neutrofili molto studiata e oramai confermata riguardante le capacità **pro-tumorali** è legata al fatto che, esse assieme ai macrofagi, i neutrofili sanno **promuovere angiogenesi**. Questo perché i neutrofili producono elevatissime quantità di **VEGF**, "**V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor", una delle citochine più potenti con azione pro-angiogenetica. I neutrofili, a differenza di altre cellule, hanno VEGF accumulato in granuli e quindi lo possono rilasciare in gran quantità e rapidamente. I neutrofili hanno bassa capacità potenziale di sintetizzare proteine, eccetto che proprio VEGF.

A parità di quantità di cellule, i neutrofili producono molto più VEGF rispetto alle altre cellule => azione quindi potenzialmente pro-tumorale

Azione anti-tumorale dei neutrofili

I neutrofili possono avere azione **anti-tumorale** attraverso il rilascio di sostanze tossiche come i derivati del metabolismo di ossigeno e azoto, che sono sostanze che possono danneggiare e uccidere le cellule tumorali, oppure anche con la produzione di citochine e chemochine, con azione diretta e indiretta:

-azione **diretta**, per es. la produzione di TNF, "Tumor Necrosis Factor", che ha azione tossica diretta contro le cellule tumorali

-azione **indiretta**, per es. produzione di TNF che è anche un inibitore dell' angiogenesi

Un' altra azione anti-tumorale consiste nella produzione di citochine e chemochine che vanno a reclutare e attivare il sistema immunitario => quindi possibile azione anti-tumorale

I neutrofili agiscono influenzati da diverse variabili: a seconda del tipo di tumore, del momento in cui sono attivati, della presenza di citochine nell'ambiente, delle cellule con le quali interagiscono, … I neutrofili possono, per es. , avere azione **anti-tumorale** se l' ambiente li attiva e li stimola a produrre mediatori che hanno la capacità di **ridurre angiogenesi**; i neutrofili possono anche uccidere direttamente le cellule tumorali con la citochina TRAIL **…..?.....**, membro della famiglia del TNF, che non ha alcun effetto sulle cellule normali.

(*Discorso poco chiaro… riasssunto veloce …)*

Nuova funzione scoperta recentemente nei neutrofili

I neutrofili possono migrare nei linfonodi prima delle cellule dendritiche. Cosa fanno? Presentano l' antigene? Non si sa ancora, però possono evidentemente trasportare materiali ai linfonodi.

(Vedi Tabella che elenca alcune delle più importanti malattie causate da un basso numero di neutrofili o da una loro disfunzione).

Patologie legate a neutropenia

Con **neutropenia** si intende la **diminuzione del numero specificodei neutrofili**. Si parla di neutropenia quando la conta è inferiore a 1500. Sotto a 500 il soggetto è in pericolo di vita: situazione gravissima. Una tale diminuzione può avere diverse cause:

-causa iatrogena, per es. allergia a farmaci

-neutropenia di tipo autoimmune, mediata da anticorpi che riconoscono gli antigeni specifici dei neutrofili

-infezione, per es. infezioni virali che possono causare neutropenia transiente

-genetica

Ci sono vari tipi di queste neutropenie, che nella maggior parte dei casi possono essere trattate con **GCSF**, "**G**ranulocyte **C**olony **S**timulating **F**actor", ossia la citochina che in maniera specifica induce la maturazione dei neutrofili agendo sul precursore midollare. In alcuni casi è però necessario il **trapianto di midollo** se la neutropenia non risponde al trattamento con GCSF, come per es. in caso di portatori di mutazione del recettore per lo stesso GCSF, oppure di mutazione in un componente del signaling attivato dal GCSF per indurre la maturazione delle cellule.

Malattie legate alla disfunzione dei neutrofili

Sono delle patologie pericolosissime e talvolta mortali. Anche queste vanno trattate con trapianto di midollo.

Decrease danger sensing che sono patologie(di recente scoperta), legate al fatto che c'è un difetto del **signaling activated receptor** e quindi i neutrofili non si attivano, con casi diversi a seconda del tipo di infezione e difetto.

Vi sono poi patologie legate a disfunzione ***inperking*** (presente nella malattia ….) legate a una disfunzione della NADPH ossidasi.

Stem cell transportation profilattica o dovuta ad antibiotici e farmaci antifungini,

"***sindrome delle cellule di Akashi"(*****non capito")(**rarissima) che è dovuta a un difetto che previene la corretta formazione dei granuli e colpisce sia i neutrofili che le cellule Nk.

Disorder of neutrophil differentation ed altre malattie genetiche di varia natura.

L'ultima patologia riguarda il malfunzionamento di una funzione dei neutrofili che comunque rimane fondamentale, la fagocitosi.

Concetto di fagocitosi: processi di ingestione di materiale extracellulare solido o liquido ed in particolare di particelle che hanno una certa dimensione(1-2um). E' un processo attivo che presume un riarrangiamento del citoscheletro visto che avviene attraverso l'estroflessione di una porzione citoplasmatica che va a racchiudere questa particella. Funzione che è data da un signaling intracellulare specifico.

Altre modalità di assunzione di materiale extracellulare: endocitosi che si suddivide a sua volta in macropinocitosi(che riguarda materiale liquido) e endocitosi mediata da recettori variabile a seconda del tipo di pathway attivato dal recettore stesso.

La fagocitosi è un processo cellulare esercitato da alcuni globuli bianchi, soprattutto cellule mieloidi come i granulociti neutrofili, macrofagi e cellule dendritiche.

Praticamente però tutte le cellule possono esercitare la fagocitosi pertanto vengono dette **fagociti non professionali** e si riferisce soprattutto a fagocitosi di materiale apoptotico.

Nel caso dei monociti/macrofagi si parla di **sistema macrofagico dell'organismo** in quanto i monociti che migrano nei tessuti danno origine a diverse popolazioni di macrofagi che sono specializzati a seconda del tessuto. Formano le cellule della microglia nel SNC, le cellule di Kupfer nel fegato, gli osteoclasti.

Funzioni biologiche legate alla fagocitosi:

- eliminazione dei patogeni
- presentazione dell'antigene(in cellule dendritiche e macrofagi attivati)
- eliminazione di cellule apoptotiche

La fagocitosi è un processo che avviene secondo una serie di tappe(illustrate in slide):

1. riconoscimento particella da fagocitare
2. legame e internalizzazione della particella con formazione del fagosoma
3. maturazione del fagosoma(soprattutto fusione con i lisosomi) che comporta dimuzione del pH all'interno di questo organello che favorisce azione di enzimi lisosomiali.
4. Attivazione NADPH ossidasi pH dipendente con degradazione particella dovuta a formazione di diversi radicali tossici dell'ossigeno.

Possono questi indurre signaling e attivazione della fagocitosi. Il riconoscimento può avvenire secondo due modalità:

1. riconoscimento diretto della particella da parte del fagocita
2. riconoscimento tramite opsonizzazione(da parte di anticorpi o di componenti del complemento);

la fagocitosi mediata da opsonine è molto più efficiente rispetto al riconoscimento diretto. (Esempio in slide effettuato in vitro sulla fagocitosi di S. Aureus da parte dei neutrofili umani. In rosso le percentuali di microbi non opsonizzati, in nero di quelli opsonizzati. In quelli opsonizzati si vede che avviene molto più rapidamente).

Il fenomeno della fagocitosi è molto rapido, avviene in pochi minuti nel momento in cui le cellule sono opsonizzate(5-10 minuti max). Questo è correlato con l'attivazione della NADPH ossidasi.

Alcuni recettori che mediano fagocitosi **non osponizzata:**

- **mannose receptors:** riconosce mannano espresso soprattutto da funghi
- TLR1 recettore che media una potente fagocitosi senza opsonizzazione. Riconosce il glucano espresso da funghi e batteri gram+.
- **CD14** che lega LPS
- **Scavenger receptor**
- Recettori coinvolti in fagocitosi mediata da **opsonine**:

- **Fc receptor**
- **CR1, CR3, CR4** che legano il complemento

Gli **Fc|□♣-receptor** riconoscono la porzione fc delle IgG le quali possono fungere da fattori opsonizzanti. Si ricordi che vi sono vari tipi di IgG(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) con diversa capacità opsonizzanti. Molto importante perché l'IF|□♣, citochina che potenzia la fagocitosi,aumenta l'espressione degli Fc|□♣ receptor e provoca **l'immunoglobulin switching** durante la risposta th1(va a spegnere l'espressione di alcune Ig come le IgE per aumentare l'espressione di Ig che fungono da opsonine).

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 18/12/2012

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia del 18/12/2012, Cassatella.

Sbobinatore: Lorenzini Riccardo

Revisore: Ioris Tommaso

(riprendendo la lezione precedente)

La fagocitosi avviene:

- Con opsonizzazione (più efficiente)
- Senza opsonizzazione

In vivo tutti i sistemi collaborano e sinergizzano tra di loro. La fagocitosi mediata da complemento amplifica l'opsonizzazione mediata dagli anticorpi.

L'immagine mostra come avviene l'opsonizzazione: il batterio è ricoperto da opsonine (iC3b, anticorpi), queste vengono riconosciute da recettori espressi dai granulociti neutrofili (riconoscibili dal nucleo), attraverso questi recettori la cellula viene stimolata a fagocitare. Infatti questi recettori sono capaci di mediare il signaling intracellulare specifico per questa funzione. (*vedi immagine al microscopio elettronico di un neutrofilo che ha fagocitato un microorganismo).* Una volta che è stato fagocitato si forma il fagosoma, si attivano i sistemi di killing mediati da radicali liberi e proteasi che uccidono la particella.

Gli anticorpi

Rappresentano uno dei meccanismi dell'immunità cellulo-specifica, sono prodotti da Linfociti B e possono svolgere varie funzioni:

- Capacità neutralizzante: legano il target (virus, particella, tossina, sostanza) e ne impediscono il legame con il recettore specifico sulla cellula bersaglio. L'anticorpo lega la particella prima che questa si vada a legare alla cellula bersaglio. Questo è il principio della vaccinazione: si induce la produzione di anticorpi contro un determinato microorganismo in modo che siano già presenti o che vengano prodotti rapidissimamente, quando eventualmente avvenga una seconda o terza reinfezione (immunità umorale).

- Opsonizzazione

- ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity): ricalca il meccanismo della opsonizzazione, tuttavia da non confondere con essa. Gli anticorpi, per esempio IgG, vanno a riconoscere un antigene sulla superficie di una cellula estranea (tumorale o alterata). Gli anticorpi legano gli antigeni estranei e la cellula viene "ricoperta" e la porzione FC,

come nell'opsonizzazione, può essere riconosciuta da FCγR, per esempio nel caso di una cellula NK. Queste cellule sono centrali nella citotossicità naturale di cellule tumorali, infettate da virus e altre estranee; in questo caso si attiva un segnale di trasduzione che stimola le cellule NK a degranulare le loro sostanze tossiche (perforine e altre).

Rilasciate nel microambiente che si forma tra cellula NK e cellula bersaglio, vanno ad uccidere la cellula bersaglio, rilasciando perforina o sono indotte ad esprimere sulla membrana altre molecole, membri della famiglia del TNF, che vanno ad indurre l'apoptosi della cellula bersaglio.

Non solo le cellule NK, ma anche i fagociti possono effettuare la ADCC. In questo caso la coda FC dell'anticorpo viene riconosciuta da un neutrofilo grazie a recettori specializzati (FcγRI; mentre il recettore della cellula NK è l'FcγRIII).

Anche gli eosinofili utilizzano questo meccanismo per uccidere macroparassiti. Gli antigeni di questi ultimi vengono riconosciuti dagli anticorpi IgE, legati alla superficie degli eosinofili i cui recettori attivano le cellule a scaricare il contenuto dei granuli che contengono delle sostanze che sono specifiche per l'uccisione dei macroparassiti. L'ADCC è funzionale anche nel caso di particelle virali, uccise da macrofagi e neutrofili secondo lo stesso principio. Gli antigeni virali esposti sulla plasmamembrana che ricopre il virus possono attivare l'ADCC. Possono attivare anche il complemento che poi attiva l'ADCC.

- Attivazione del complemento (legame tra immunità innata e immunità specifica): il complemento attivato attiva fenomeni biologici quali: potenziamento della fagocitosi, infiammazione e lisi dei microbi, attraverso la formazione del MAC.

Recettori per Ig

I recettori che mediano queste azioni biologiche sono gli FcRs. *(cfr. tabella)*

Gli FcγR legano la coda delle IgG. Ci sono poi gli FcεR e gli FcαR.

FcγR

Sono di 3 tipi, con diversa affinità per le Ig:

1. FcγRI (CD 64): alta affinità per IgG1 e IgG3; è espresso quasi esclusivamente sui fagociti (macrofagi e neutrofili, e cellule dendritiche). Sui macrofagi esso è presente costitutivamente, in altre cellule deve invece essere indotto; nei neutrofili infatti l'IFNγ aumenta o induce l'espressione dell' FcγRI. Questo recettore media la fagocitosi ma anche l'ADCC.
2. FcγRII (CD32): esistono

- FcγRIIA (CD32A) e FcγRIIC (CD32C) : hanno azione attivatoria e sono espressi sui fagociti. Sono recettori che possono mediare la fagocitosi.
- FcγRIIB (CD32B) : è espresso prevalentemente sui linfociti B ed ha azione inibitoria. Ha azione modulatoria negativa, nel momento in cui viene attivato. Può essere espresso anche su fagociti.

1. FcγRIII (CD16): esistono

- FcγRIIIA (CD16A) : espresso sulle NK, e media l'ADCC
- FcγRIIIB (CD16B) : espresso sui neutrofili, segnala debolmente quindi ha bisogno di agganciarsi probabilmente a FcγRII, espresso sulle stesse cellule, per mediare la fagocitosi.

La capacità di questi recettori di indurre un segnale di attivazione o un segnale di inibizione è data dalla capacità del loro dominio intracellulare di mediare direttamente o indirettamente un segnale positivo o negativo. Questo dipende dal fatto che alcuni di questi recettori che hanno azione attivatoria presentano a livello del dominio intracellulare un dominio chiamato **ITAM**

(Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). FcγRIIA e FcγRIIC hanno questo dominio cruciale perché attiva una cascata di trasduzione positiva.

Al contrario, FcγRIIB ha un dominio **ITIM** (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif). Questo dominio recluta delle proteine di trasduzione che hanno azione negativa, di spegnimento del segnale indotto da parte dell'altro FcR o altri recettori attivatori.

Per quanto riguarda FcγRI e FcγRIIIA, questi recettori di per sé non hanno domini regolatori, ma segnalano perché reclutano altre catene accessorie, ovvero le **γ-chain**, che hanno capacità di attivare e segnalare. Esse infatti sono catene accessorie che hanno omologia con le catene ζ (del TCR) e che hanno a livello della loro porzione intracitoplasmatica un dominio ITAM. La γ-chain è reclutata anche da un altro recettore, FcεRI, che è il recettore espresso dagli eosinofili e dai mastociti. Essi legano le IgE.

Quindi da un lato alcuni recettori Fcγ segnalano direttamente, mentre altri Fcγ segnalano indirettamente reclutando queste catene accessorie.

I reccettori Fcγ hanno alta affinità per le IgG1 e IgG3. Queste immunoglobuline sono le stesse dotate di proprietà opsonizzanti. I recettori che mediano la fagocitosi (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIC, FcγRIIIB) possono essere legati in varie situazioni, per esempio quando si formano immunocomplessi, i quali possono attivare, tramite legame con i vari FcRs, sui vari tipi di leucociti, così le funzioni delle stesse cellule. Quindi, oltre alla fagocitosi e all'ADCC, può essere anche stimolato il rilascio di mediatori da parte delle stesse cellule. Tutte queste funzioni hanno importanza nelle patologie in cui si formano immunocomplessi che possono stimolare e causare danno, e se non vengono eliminati in maniera appropriata permangono e continuano a stimolare le cellule e ciò può rappresentare la patogenesi di malattie autoimmuni e non-autoimmuni.

(vedi review)

Artrite reumatoide,malattia infiammatoria renale e malattia infiammatoria della pelle in cui l'alterazione di questi sistemi gioca un ruolo importante nella patogenesi, dimostrabili in modelli animali.

Recettori per altre opsonine

Per quanto riguarda altre opsonine importanti, cioè frammenti derivati dall'attivazione del complemento, i recettori che legano questi frammenti opsonizzanti sono:

- CR1: lega C3b con alta affinità, ma anche altre opsonine
- CR3: lega iC3b (prodotto di degradazione del C3b)
- CR4: lega C3b

Questi sono i principali fattori opsonizzanti. Ogni anno tuttavia vengono trovate nuove sostanze, soprattutto appartenenti al sistema delle proteine della fase acuta (ficoline, collectine, pentraxine), proteine sieriche prodotte da fagociti e altre cellule, e tra le cui varie funzioni c'è l'opsonizzazione. Oggi si parla dunque di un sistema di immunità umorale naturale o innata, di cui fanno parte queste proteine che svolgono funzioni simili a quelle degli anticorpi; essa è diversa dall'immunità umorale specifica costituita dagli anticorpi prodotti dalle cellule dell'immunità specifica.

Zipper mechanism

Il riconoscimento da parte delle opsonine di un microrganismo estraneo, porta all' "avvolgimento" del microbo, con quello che si definisce come **zipper-mechanism**, "a cerniera" *(vedi figura)*, per il quale i recettori inviano alle cellule un segnale che fa sì che le cellule emettano degli pseudopodi che avvolgono lentamente fino a racchiudere la particella. Si è scoperto che durante questo processo c'è un attivo metabolismo di fosfolipidi man mano che si formano gli pseudopodi, e che inoltre cambia il tipo di fosfolipidi; meccanismi importanti da conoscere per poter inibire la fagocitosi nel caso in cui sia necessario. Gli FcRs sono localizzati in protrusioni della membrana, le quali servono come "antenne" nel caso in cui ci sia una particella da fagocitare ricoperta da anticorpi. Nel momento in cui essi trovino una porzione Fc da legare, si riorganizzano e clusterizzano in una stessa area e lentamente inducono il processo di avvolgimento a cerniera.

Meccanismi di trasduzione in FcγRs, CR e dectina, formazione del fagosoma

La capacità di questi recettori (FcγRs, CR, o altri recettori che riconoscono direttamente agenti patogeni senza bisogno di opsonine, tipo Dectin-1) di indurre la fagocitosi è quindi legata al fatto che essi, attraverso il loro dominio ITAM reclutano una proteina chinasi chiamata **Syk**.

Syk è cruciale perché una volta attivato è in grado di attivare segnali di trasduzione downstream fondamentali per la fagocitosi (processo studiato principalmente su FcγRs). Quindi si ha

riconoscimento del frammento Fc delle immunoglobuline che rivestono il microrganismo,

clustering, cioè assemblamento in una regione specifica della maggior parte di questi recettori, fosforilazione dei motivi di tirosina di questi recettori nei loro domini ITAM; questi sono ricchi di tirosine che vengono fosforilate da varie tirosin-chinasi, e in seguito a queste fosforilazioni, i domini stessi diventano siti di legame per Syk. Questo fosforila poi a valle proteine bersaglio le quali poi producono varie risposte, tra cui la capacità di indurre fagocitosi.

Topi knock-out aiutano a dimostrare l'importanza di queste proteine a livello della trasduzione in una determinata funzione che si studia. Topi knock-out per queste chinasi proteine supportano l'importanza di questa cascata di trasduzione per quanto riguarda la fagocitosi mediata da FcγR.

Il signaling mediato da CR3 porta all'attivazione del Syk, il quale attiva le proteine a valle. Il signaling mediato da dectina, altro recettore importante per la fagocitosi, ancora una volta importante il coinvolgimento del Syk e di altre tirosin chinasi che funzionano a livello del dominio intracellulare; nel caso della dectina questo segnale porta all'inattivazione di fosfatasi che si trovano sulla membrana e che mantengono inattivi questi recettori. Quindi ogni recettore ha un signaling base che poi diventa specifico a seconda del tipo di recettore.

Un'altra evidenza dell'importanza di queste molecole è dimostrata dal fatto che i batteri e gli agenti patogeni hanno imparato a difendersi dai meccanismi innescati dal sistema immunitario. Ci sono moltissimi batteri che possono produrre delle sostanze, o esprimere all'interno del loro genoma dei geni che codificano per delle proteine batteriche specifiche, che vanno a interferire con questi sistemi. Per cui, alcuni batteri sono in grado di impedire il legame del batterio stesso con il recettore, o batteri che producono delle sostanze che interferiscono con i trasduttori del segnale innescati da questi recettori.

FcγRIIB è recettore inibitorio, cioè modula negativamente il segnale attivato da altri recettori FcR, per esempio. Esso attraverso il dominio ITIM recluta 2 fosfatasi **SHIP e SHP**: esse quando sono reclutate e attivate da questo recettore, vanno a defosforilare delle proteine bersaglio. SHIP inibisce Syk, la PI3K, e altri trasduttori. Queste fosfatasi quindi inibiscono il signaling attivato da un altro recettore dal quale la cellula viene attivata contemporaneamente.

Per esempio *(vedi slide):* FcγRIII tramite ITAM attiva il Syk, il quale attiva Btk e PLCγ che sono essenziali per il signaling; nel caso di un'attivazione simultanea di FcγRIIB, tramite ITIM la chinasi va ad inibire Btk e PLCγ. Esso serve quindi a modulare l'azione attivatoria degli FcγR nel caso in cui la cellula esprima entrambi i tipi di recettori, caso soprattutto dei linfociti B.

Una volta che si attiva il signaling, avviene l'attivazione della membrana che porta ad avvolgere la particella e si forma un **fagosoma**, che è un vacuolo intracellulare che contiene la particella ingerita. Questo fagosoma subisce una serie di modificazioni, nell'insieme dette <u>maturazione</u>: essa consiste in una serie di tappe che prevedono la fusione del fagosoma con alcuni compartimenti intracellulari, soprattutto lisosomi nel caso di macrofagi e neutrofili; questa fusione (fagosoma precoce – fagosoma tardivo – fagolisosoma) porta anche un'acidificazione dell'ambiente all'interno di questi vacuoli, la quale favorisce l'azione di enzimi litici che lavorano bene a pH acido. Si conoscono molto bene i segnali di trasduzione e le proteine intracellulari che mediano questi processi, che sono spesso bersaglio di patogeni intracellulari che cercano di sfuggire alla fagocitosi, o alla formazione del fagolisosoma, o all'azione tossica dei radicali liberi dell'ossigeno. Mano a mano che il fagosoma matura, la cellula "impara a fare la cosa giusta", a seconda della particella fagocitata, del tipo di maturazione che subisce, si specializza grazie all'azione di queste proteine che agiscono durante la maturazione del fagosoma. Queste informazioni sono state ottenute tramite topi knock-out e biologia molecolare. Alcuni batteri (patogeni intracellulari) riescono a mettere in moto dei meccanismi che cercano di modificare il fagosoma e il processo di maturazione.

Per esempio, Helicobacter Pylori per difendersi sequestra la proteina Rab7 che è fondamentale nel momento in cui il fagosoma si fonde con il lisosoma per favorire lo scaricamento delle proteasi. Anche i micobatteri sono in grado di alterare la maturazione del fagosoma. Per eliminare questi microrganismi intracellulari che hanno la capacità di sfuggire alla fagocitosi e a sistemi

precostituiti, interviene l’attivazione del macrofago, che, durante un’infezione cronica del sistema immunitario, potenzia le capacità del macrofago attivato.

Gli agenti patogeni a tutti i livelli possono utilizzare delle strategie per difendersi. Nel caso dei micobatteri possono per esempio resistere al killing anche quando sono fagocitati, e addirittura moltiplicarsi all’interno del vacuolo fagocitario, utilizzandolo per infettare la cellula stessa. Ad esempio i neutrofili possono fagocitare i patogeni intracellulari, senza distruggerli; essi quindi si moltiplicano, fuoriescono dal neutrofilo e vanno ad infettare un macrofago, che magari è la vera cellula bersaglio. Il neutrofilo funge quindi da una sorta di “cavallo di troia”.

Meccanismi di difesa usati dai patogeni: resistenza al killing, inibizione della fusione del fagosoma con il lisosoma, produzione di sostanze che legano e impediscono il legame dei recettori per l’attivazione della fagocitosi, uccisione dei fagociti nel caso di infezioni massive.

Malattie ereditarie che interferiscono con la fagocitosi (sindrome di Chedic-Higashi, CGD) possono avere un’influenza sulla diminuita capacità fagocitaria dei fagociti.

Il segnale degli FcγR, dectin-1 e altri non solo attiva la fagocitosi ma può attivare altre funzioni delle cellule. Per esempio FcγRIIA via Syk, non solo attiva il riarrangiamento del citoscheletro, ma si può attivare anche:

- Burst. Dopo la fagocitosi del microorganismo ci dev'essere, nel fagosoma, l'azione della NADPHossidasi.

- Attivazione della trascrizione genica. Le citochine pro infiammatorie sono stimolate moltissimo. Quando una cellula fagocita un microorganismo la cellula inizia trascrivere geni proinfiammatori di molecole proinfiammatorie.

- Rilascio di mediatori pro infiammatori. Mediatori precostituiti e che vengono esocitati (es. degranulazione dei granulociti o macrofagi che rilasciano mediatori pro-infiammatori).

Nella fagocitosi la cellula mangia il microorganismo, e contemporaneamente va ad informare l'ambiente circostante se c'è bisogno di nuove cellule per combattere l'agente patogeno e terminare il processo.

La fagocitosi ha una azione importante anche nel processamento dell'antigene; strutture che vengono processate e funzionano come antigeni presentati ai linfociti T.

Un agente patogeno viene riconosciuto dalle cellule del sistema immunitario innato attraverso i **PRR che riconosce i PAMPs** e il riconoscimento attiva varie risposte del sistema immunitario innato:

- fagocitosi

- eliminazione attraverso l'azione di peptidi antimicrobici scaricati a livello extracellulare

- opsonizzazione

- fagocitosi da parte di cellule dendritiche, che risulterà nella presentazione dell'antigene specifico. Questo attiverà la risposta immunitaria adattativa che servirà ad una definitiva eliminazione dell'agente patogeno che l'ha indotta.

Efferocitosi

Un'altra funzione della fagocitosi è la capacità dei fagociti (macrofagi e altre cellule) di fagocitare corpi apoptotici; provenienti da cellule andate incontro ad apoptosi fisiologicamente per l'omeostasi, oppure durante le risposte infiammatorie. La fagocitosi da parte dei macrofagi delle cellule apoptotiche (nelle risposte infiammatorie) è importante perchè nel caso della fagocitosi di batteri, opsonizzati e non, i macrofagi producono citochine pro-infiammatorie come TNF, IL-1beta, IL-8, chemochine e induce il TGFbeta (sostanza antinfiammatoria). La fagocitosi di batteri promuove la risposta infiammatoria, mentre la fagocitosi di corpi e

cellule apoptotiche, poiché impegna recettori diversi da quelli per la fagocitosi di microorganismi, cambia la risposta trascrizionale di queste cellule e quindi tutto questo favorisce una risposta antinfiammatoria. Le citochine proinfiammatorie sono inibite e sono attivate altre citochine come TGFbeta1. Sono anche modulate altre molecole dai due tipi di fagocitosi come IL-8 e MCP-1 (monocite chemotactine protein) che è CCL2. Questa è una chemochina importante per il reclutamento di monociti, macrofagi e cellule dendritiche e può diminuire la produzione dei chemochine in generale sia per i neutrofili che per le cellule mononucleate. Avviene anche la diminuizione della IL-12 (attiva nella risposta infiammatoria).

Aumentano IL-10, TGFbeta1 e la PGA-2 che può avere un ruolo o attivatorio o inibitorio a seconda della fase in cui viene prodotta perchè incontra recettori diversi, che possono segnalare attraverso AMPc.

Un macrofago attivato nel caso di infiammazione acuta viene attivato da mediatori proinfiammatori e comincia a produrre fattori che richiamano neutrofili, i quali vanno incontro ad apoptosi e poi vengono fagocitati dal macrofago che cambia la sua espressione genica e va a produrre PGA2 e TGFbeta che vanno ad inibire l'espressione di mediatori proinfiammatori e favoriscono il processo di risoluzione.

Il macrofago riconosce la cellula apoptica che viene fagocitata e digerita e i componenti vengono o eliminati o riutilizzati per altri scopi. Il macrofago può produrre TGFbeta, che ha molte azioni a seconda della cellula bersaglio e dell'ambiente in cui si trova.

In questa situazione innesca processi che favoriscono la risoluzione dell'infiammazione. TGFbeta è una delle più importanti citochine ed è capace di inibire le risposte immunitarie specifiche ed è fondamentale per innescare la fibrosi, la proliferazione di fibrobasti e la produzione di connettivo.

È importante anche per la funzione chiamata epithelial mesenchimal transition.

La fagocitosi delle cellule apoptotiche può anche determinare il rilascio di inibitori delle proteasi che giocano un ruolo fondamentale nella regolazione delle proteasi. Gli inibitori sono costitutivamente presenti nell'ambiente extracellulare ad altissimi livelli e questo può sempre evitare eventuali azione indesiderate delle proteasi che possono fuoriuscire per varie situazioni. Durante la risposta infiammatoria acuta abbassano la quantità di proteasi, quando questa eccede. Tutte le risposte biologiche sono bilanciate tra fattori positivi e negativi. Ci sono altre sostanze che possono avere altre azioni sempre importanti per la risoluzione dell'infiammazione.

Questo processo della fagocitosi da parte dei macrofagi di corpi apoptotici si chiama **efferocitosi**, ed è suddivisibile in altre fasi.

All'inizio i macrofagi tissutali (o quelli appena reclutati dal sangue) hanno una tipologia di tipo **M1** proinfiammatori, poi cominciano a fagocitare i corpi apoptotici e diventano **M2-like** antiinfiammatori, quando è pieno il macrofago diventa (?) ed è capace di fare altre funzioni e migrare nei linfonodi. Questa efferocitosi è molto dinamica e determina varie tappe di maturazione, cambiamento del macrofago, del programma maturativo-genetico.

Quali sono i recettori che sono implicati nel riconoscimento da parte dei fagociti dei corpi apoptotici? E quali sono i sistemi utilizzati ed espressi dai corpi apoptotici per essere riconosciuti? Queste molecole sono tantissime e sono recettori di diverse categorie. Gioca un ruolo importante in questo riconoscimento la fosfatidil-serina che è un lipide che normalmente si trova sulla faccia interna della membrana plasmatica. Una cellula apoptotica subisce una serie di cambiamenti e tra questi vi è anche un rovesciamento della struttura della membrana, la parte interna viene esposta e viene riconosciuta da recettori.

Ancora una volta il processo della fagocitosi dei corpi apoptotici può essere spezzettato in fasi: si è scoperto che i materiali dei corpi apoptotici possono richiamare le cellule (fagociti) che liberano dei mediatori e segnali che si chiamano **find me signaling** (soprattutto lipidi come le lisofosfatidilcolina, ma anche nucleotidi, AMPc).

Dopo c'è una fase **eat me/tickling**, una fase in cui la cellula apoptotica espone i ligandi che saranno riconosciuti dai recettori espressi da altri fagociti (tantissimi!), questo riconoscimento porterà alla fase di avvolgimento (**engulfment**) del corpo apoptotico mediato da altre proteine regolatrici. Una volta che si forma il vacuolo di materiale apoptotico c'è una fase di **processing** in cui il materiale viene degradato, scomposto ed eliminato; oppure riutilizzato dalla cellula.

La conseguenza di questo processo riguarda 3 eventi:

1. la rimozione dei corpi apoptotici è collegata ad una aumentata secrezione di citochine che porta alla risoluzione del processo e alla guarigione;

2. utilizzo del materiale apoptotico che viene fagocitato. Il materiale apoptotico può anche essere messo in contatto con i recettori all'interno del nucleo e quindi può contribuire all'attivazione della trascrizione. Questo comporta il cambiamento della trascrizione.
3. Il processamento degli antigeni associati alle cellule apoptotiche. Questi sono molto importanti perchè sono implicati nella tolleranza nei confronti del self. Viene protetto da un eventuale attacco del sistema immunitario nel caso in cui il materiale venga riconosciuti come estraneo. Difetti di questo processo sono collegati allo sviluppo di malattie autoimmuni *(cfr. tabella)*. Conosciamo una serie di patologie autoimmuni collegabili ai difetti di quelle molecole.

Il riconoscimento degli agenti patogeni da parte dell'immunità innata

Premi Nobel dell'anno scorso, Bruce Beutler, Jules Hoffmann, Ralph M. Steinman, per le loro ricerche sull'immunità innata.

Il riconoscimento di agenti patogeni avviene da parte di recettori che si definiscono pattern recognition receptors (**PRR**). Riconoscono ligandi espressi a livello dei microorganismi patogeni, che si chiamano **PAMPS** (pathogen associated molecular patterns).

Esempi di PAMPS: acidi nucleici virali attericifungini, proteine estranee all'ospite, componenti lipidici che fanno parte della parete dei batteri (sia gram + che gram-) e carboidrati espressi in maniera specifica per esempio da funghi.

I PRR sono espressi da cellule della immunità innata: macrofagi, neutrofili, DC, monociti. Il sistema innesca le risposte necessarie per eliminare il microorganismo attraverso la formazione di mediatori, e favorisce lo sviluppo dell'immunità specifica adattativa. Il riconoscimento dei PAMP da parte dei PRR innesca la produzione di citochine proinfiammatorie specifiche. Il sistema PAMP-PRR diventa importante per il reclutamento e l'amplificazione dell'immunità innata specifica. L'interazione può attivare le cellule a produrre sostanze tossiche: radicali liberi dell'ossigeno, dell'azoto, peptidi antibiotici e, soprattutto nel caso delle DC, il riconoscimento è fondamentale per creare l'ambiente adatto nel momento in cui la cellula DC presenta l'antigene. I PRR inducono in maniera specifica quelle citochine che poi saranno fondamentali per organizzare la risposta immunitaria (linfociti T helper).

I PRR riconoscono strutture dei microorganismi che sono cruciali e specifiche per la sua sopravvivenza. Sono dei bersagli sicuri a cui l'ospite mira. I PRR sono espressi costitutivamente dall'ospite e riconoscono i patogeni indipendentemente dal punto del ciclo vitale in cui si trovano.

Sono già presenti nelle linee cellulari, non sono clonali e sono indipendenti dalla memoria immunologica. I PRR sono costitutivamente presenti, non cambiano mai, ma l'espressione può essere modulata e riconoscono strutture essenziali degli agenti patogeni.

Si possono individuare PRR: secreti, su membrana, oppure all'interno della cellula.

È come se anche a livello dell'immunità innata esista una risposta specifica per le strutture dei batteri.

Esempi di PRR:

- membrana: TLR, lectine

- endosomiali: alcuni TLR

- citosolici intracellulari: vanno a riconoscere PAMPs intracellulari (batteri o virus che hanno infettato la cellula entrando nel citoplasma).

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 19/12/2012

19/12/2012 Stefano Antonelli

Patologia Gen e Fisiopatologia Clinica

prof. Dusi

FLOGOSI ACUTA

Si manifesta con una serie di FENOMENI:

- VASCOLARI: modificazione dei vasi che porta ad un maggiore afflusso di sangue e quindi di maggiore ossigeno ai tessuti sofferenti. La zona diventa rossa (RUBOR)

- ESSUDATIVI: non solo arriva più sangue ma anche più liquido.

- MIGRATORI: cellule migrano fuori dai vasi

- DEGENERATIVI: legati non solo all'azione degli agenti che hanno causato l'infiammazione ma anche dall'infiammazione stessa. Le cellule dell'infiammazione (leucociti) producono radicali liberi dell'ossigeno e enzimi che sono utili nell'uccisione di batteri e di cellule infettate da virus, ma vanno anche a danneggiare i tessuti sui quali si svolge l'infiammazione (motivo per cui sono stati inventati gli antinfiammatori: l'azione difensiva della risposta immunitaria si accompagna ad effetti collaterali che in alcuni casi sono talmente pesanti che rendono necessario un intervento esterno mirato a bloccare l'infiammazione)

L'infiammazione, a seconda delle caratteristiche dell'essudato (liquido che esce dai vasi per permeabilità e forma una raccolta intorno ai vasi), prende diversi nomi. Questi nomi indicano non tanto diversi meccanismi di formazioni e di instaurazione della flogosi, ma indicano variazioni sul tema di questi meccanismi: i meccanismi sono sempre gli stessi, però a seconda se prevale uno o l'altro fenomeno si hanno aspetti diversi e clinicamente molto rilevanti.

FLOGOSI ERITEMATOSA: prevalgono fenomeni vascolari (vasodilatazione)

FLOGOSI SIEROSA: se prevale modificazione permeabilità e quindi particolare fuoriuscita di liquido

FLOGOSI FIBRINOSA: se prevalgono fenomeni coagulativi (il liquido coagula)

FLOGOSI CATARRALE: all'essudato si aggiungono muco e cellule di sfaldamento facendo diventare vischioso l'essudato

FLOGOSI PURULENTA: prevalgono fenomeni migratori (fuoriuscita di globuli bianchi dai vasi)

FLOGOSI NECROTIZZANTE: prevalgono fenomeni degenerativi

FLOGOSI EMORRAGICA: interessamento dei vasi (danno vascolare con emorragia)

Esistono anche tutte le forme intermedie e tutte le possibilità di passaggio da una forma all'altra:

Forme miste: FIBRINOSO-NECROTICA (parte fibrosa con fenomeni necrotici importanti)

SIERO-EMORRAGICA (essudato sieroso con emorragie)

MUCO-PURULENTA

SIERO-MUCOSA

ecc….

Tutte le forme intermedie e le forme miste sono possibili

Di solito nella flogosi c'è un'iniziale fase comune (di solito flogosi eritematosa). Poi la flogosi può rimanere eritematosa o può evolvere negli altri tipi secondo la prevalenza del fenomeno.

FLOGOSI ERITEMATOSA (ERITEMA significa arrossamento)

La flogosi eritematosa è una flogosi in cui prevale l'arrossamento dovuto a fenomeni vascolari: vasodilatazione e iper afflusso di sangue nella sede di flogosi

È la fase iniziale di tutte le flogosi, poi la flogosi eritematosa può restare eritematosa e terminare o può evolvere in altri tipi di flogosi

Caratteristiche:

- Iperemia attiva: eccesso di arrivo di sangue con vasodilatazione attiva (si rilasciano gli sfinteri dei vasi capillari)

- Essudazione e migrazione (sono le fasi successive sono pressoché assenti

Nella flogosi eritematosa acuta pura che non evolve in altre forme si ha solo un arrossamento della zona per iper afflusso di sangue

È una flogosi lieve non particolarmente grave (es. danno ai vasi cutanei per una botta lieve, ustione di primo grado, eritema solare)

Cause:

- sostanze chimiche poco irritanti o in basse dosi

- stimoli fisici lievi (U.V., calore)

È aspecifica: non è patognomonica (non da informazioni sulla causa)

FLOGOSI SIEROSA (sierosa perché il liquido che esce dai vasi ha un aspetto simile al siero ma non è siero perché contiene i fattori della coagulazione e può coagulare se questi fattori sono attivati)

(PLASMA: liquido che scorre nei vasi con tutte le sue proteine comprese quelle della coagulazione; SIERO: plasma privato dei fattori della coagulazione)

È un liquido limpido, trasparente perché contiene pochi globuli bianchi: c’è molta più fuoriuscita di liquido rispetto alla chemiotassi (es liquido contenuto nella vescica di una ustione di secondo grado)

La fuoriuscita massiva di questo liquido può comportare problemi circolatori al paziente (riduzione volemia, disidratazione)

Caratteristiche:

- Liquido limpido, simile a trasudato, ma con più proteine e globuli bianchi (non in grandissimo numero)

- Componente cellulare molto scarsa (per questo motivo è limpido)

- Non c’è fibrina: c’è il fibrinogeno ma non la fibrina. Se il liquido coagula si passa alla flogosi fibrinosa

Polmonite: infiammazione degli alveoli polmonari. Negli alveoli avviene la flogosi: esce dai capillari polmonari del liquido limpido che si accumula all’interno degli alveoli.

Gli alveoli che dovrebbero essere liberi e riempiti soltanto di aria, si riempiono di acqua: la presenza di acqua negli alveoli comporta che non arrivi o che faccia fatica ad arrivare aria e di conseguenza il paziente può avere problemi di respirazione.

Se il focolaio bronco polmonitico è ristretto il medico ascoltando il torace sentirà dove il polmone è libero il normale crepitio degli alveoli che si aprono e si chiudono, mentre sentirà dove c’è il liquido il rumore di bolle tipico dell’aria che entra nell’acqua. Questi rantoli indicano che c’è un focolaio di polmonite.

La polmonite può essere localizzata a pochi alveoli ma può anche essere estesa all’intero polmone o può coinvolgere ance entrambi i polmoni.

Si parla quindi di ALVEOLITE SIEROSA: presenza di liquido simile al siero all’interno dei polmoni.

La flogosi sierosa può evolvere in altri tipi di flogosi (siero-fibrinosa, purulenta) o può rappresentare un fenomeno satellite (presenza di un’altra infiammazione con essudato fibroso come contorno: ascesso, TBC, angine streptococciche)

Localizzazione varia:

- PERICARDITE, PLEURITE, PERITONITE

La flogosi di tipo siero diventa particolarmente grave quando avviene nelle sierose: pericardio, pleure, peritoneo.

Nella pleurite il liquido essudatizio sieroso si raccoglie nel sacco pleurico formando un livello di liquido alla base del polmone del paziente.

Il medico con la percussione del torace sente il suono chiaro polmonare (rimbombo che indica la presenza di aria nel polmone). Quando raggiunge il liquido, si sente un suono ottuso dovuto alla presenza di acqua.

Il liquido si sposta a seconda di come si mette il paziente.

Alla radiografia, si osserva una opacità radiologica dovuta all’acqua con un limite netto.

Quando c’è una grossa quantità di liquido all’interno dei foglietti pleurici si parla di VERSAMENTO PLEURICO.

(A seconda della localizzazione: VERSAMENTO PLEURICO, VERSAMENTO PERITONEALE, VERSAMENTO PERICARDICO. Si può utilizzare un sinonimo: IDROTORACE, IDROPERITONEO, IDROPERICARDIO)

La conseguenza della presenza del liquido dipende dalla sua quantità: se è poco non ci sono grossi problemi

Nel versamento pleurico: se è molto può limitare la compliance dei polmoni, limita la capacità del polmoni di espandersi. Il paziente sarà dispnoico (difficoltà a respirare).

Nel versamento pericardico: se è molto può limitare la diastole del cuore, il cuore non si riempirà a sufficienza e la successiva sistole non sarà sufficiente per mantenere una buona gettata sistolica. Il paziente avrà una sintomatologia detta "da tamponamento cardiaco": il cuore è tamponato, cioè stretto nella morsa del liquido e non può quindi dilatarsi bene. Quando si ascolta il cuore, si sente che i toni cardiaci sono molto lontani per lo spessore di liquido; quando si fa la percussione dell'area cardiaca, si sente un suono ottuso; quando si fa una lastra, si vede un livello di liquido nel sacco pericardico.

Lo stesso avviene per il peritoneo.

Come si interviene sul paziente: se il liquido non è tanto si danno diuretici (per eliminare i liquidi) e antinfiammatori (per bloccare l'infiammazione).

In caso di molto liquido e quindi di un'insufficienza cardiaca grave o un'insufficienza respiratoria grave, il medico può introdurre una cannula o un ago e aspirare il liquido (centesi: asportazione del liquido manuale) per detendere.

In questi casi comunque la somministrazione di antinfiammatori è importante: se non si blocca l'infiammazione si avrà una continua produzione di liquidi e il polmone non si libererà mai. Bisogna eliminare la causa.

Nella peritonite, un versamento peritoneale andrà a ostacolare la normale peristalsi intestinale. Il soggetto avrà dolore addominale e problemi di peristalsi, digestione.

Il versamento di liquidi (non è una cosa rara) può dare grossi problemi al funzionamento di questi organi che sono chiusi in questi sacchi sierosi.

- SINOVITE ACUTA SIEROSA (traumi, infezioni periarticolari)

Accumulo di liquido nel cavo articolare: il soggetto avrà limitazioni più o meno gravi del movimento, turgore e dolore.

Trattamento: antinfiammatorio e antibiotico se si tratta di una sinovite dovuta a batteri

- VAGINALITE SIEROSA (traumi, infezioni)

Liquido nella tonaca vaginale del testicolo

- USTIONI DI II GRADO

Vescica contiene liquido sieroso. Se in grossa quantità possono dare disidratazione.

- MENINGITI (TBC)

- ORTICARIA (pomfi)

- ASMA ALLERGICO (nell'ambito della parte bronchiale con restringimento del bronco e difficoltà nella respirazione)

Allergia: attivazione di un meccanismo infiammatorio da parte dell'immunità

- se non si raccoglie in cavità ma questo liquido INFILTRA TESSUTI, questi diventano edematosi e arrossati (cute, parenchimi): sensazione di tensione, dolore, prurito

- NON INTERESSA LE MUCOSE

Cause:

-agenti nocivi ad azione non molto intensa: (sostanze chimiche, agenti fisici, agenti infettivi, tossine, immunocomplessi)

- non è patognomonica: la presenza di liquido sieroso non da indicazioni sulla causa

FLOGOSI CATARRALE

- Propria delle mucose aventi strutture secernenti

- Essudato (CATARRO) liquido sieroso si mescola con il muco secreto dalle mucose (ipersecreto in caso di infiammazione perché l'essudato irrita le mucose). La flogosi catarrale si può quindi avere nelle strutture muco secernenti.

- È un essudato ricco di muco e di cellule di sfaldamento, filante, vischioso. Questo tipo di essudato provoca ostruzione.

FARMACO MUCOLITICI: sono stati inventati per tagliare le mucine (proteine del muco responsabili della vischiosità) e quindi sciogliere il catarro.

- Facile trasformazione in altri tipi di essudato.

Localizzazione: si chiama catarrale l'infiammazione di qualsiasi mucosa interna

Enteriti (colera, tifo, intossicazioni alimentari)

Riniti, faringiti, laringiti, bronchiti (virus, batteri, fumo)

Cistiti (bile non secreta perché la colecisti è ostruita dal catarro)

Uretriti

Metriti

Cause:

- Virus: influenzale, rinovirus, echovirus, reovirus

- Batteri: haemophilus, salmonella, vibrio, ecc…

- Sostanze tossiche o irritanti

Conseguenze:

- Ostruzione di organi cavi

FLOGOSI FIBRINOSA

L’essudato sieroso coagula: l’essudato che prima era liquido, diventa solido, compatto e diventa tanto più solido quanta più acqua è espulsa dal reticolo di fibrina.

Questo essudato solido da problemi molto gravi

La coagulazione dell’essudato è dovuta alla presenza di un patogeno capace di attivare la coagulazione attraverso qualche sua componente o creando la condizione nel tessuto per l’attivazione della coagulazione.

Anche in assenza di batteri un essudato può coagulare: è sufficiente che si creino le condizioni che permettano l’attivazione della coagulazione.

Caratteristiche:

- molta fibrina (prevalenza dei fenomeni coagulativi)

- scarsa componente fluida (aspetto solido) per drenaggio della parte liquida

Localizzazione:

nei tessuti :

- ALVEOLITE FIBRINOSA (pneumococco, klebsiella, staphilococcus aureus coagulasi+, haemophilus)

Liquido coagula. La guarigione sarà più lenta, più difficile e lascerà molti più danni. Deve prima essere sciolta tutta la fibrina e poi deve essere riassorbito il liquido.

Il passaggio da sierosa a fibrinosa dipende dal microrganismo: agenti microbici che producono coagulasi favoriscono la coagulazione.

- INTERSTIZIO TESSUTALE (occlusione vasi)

Se avviene intorno ai vasi si può avere occlusione dei vasi e quindi ischemia (infarto).

sulle mucose:

- DIFTERITE (laringea, tracheobronchiale, tonsillare, nasale, ecc…)

Corinebacterium Diphteriae: causa un’essudazione e attraverso la produzione della sua tossina causa la coagulazione dell’essudato. Si formano pseudomembrane (concrezioni di essudato coagulato) che ostruiscono il laringe.

- TONSILLITE STREPTOCOCCICA (crup)

- DISSENTERIA BACILLARE (shigella)

- ENTEROCOLITE MEMBRANOSA

C. Difficile: provoca infiammazione del colon con fuoriuscita di liquido (essudato siero-mucoso)e attraverso la produzione delle sue tossine provoca la coagulazione dell'essudato.

Questi coaguli sono strappati dall'intestino durante il transito intestinale provocando intenso sanguinamento: il paziente ha quindi dei periodi di stipsi alternati a attacchi di diarrea con sanguinamento profuso con espulsione di pseudomembrane.

- COLECISTITI

- LESIONI ULCERATIVE (traumi, corrosivi, ulcera)

La rimozione delle pseudomembrane è difficile anche chirurgicamente: aderiscono profondamente alle mucose e il tentativo di strapparle provoca sempre intenso sanguinamento perché si strappa anche la mucosa.

sulle sierose:

- PLEURITI SECCHE (TBC)

- PERICARDITI (infarto, RAA)

- PERITONITI (per appendiciti, colecistiti)

La coagulazione dell'essudato (con formazione di pseudomembrane) può avvenire ina altri organi:

PLEURE: coagulazione dell'essudato porta alla formazione di concrezioni sulle opposte superfici pleuriche.

Le pleure nello scorrimento produrranno un caratteristico rumore: SFREGAMENTO PLEURICO.

Se le pseudomembrane si impiantano a ponte fra due pleure formano le ADERENZE PLEURICHE: il polmone è imbrigliato al torace e non può più espandersi.

Lo stesso può avvenire nel pericardio (PERICARDITE FIBRINOSA), nell'intestino (ADERENZE INTESTINALI, ADERENZE PERITONEALI)

Se non si interviene in tempo bloccando l'infiammazione la fibrina può essere sostituita da collagene attraverso i fibroblasti con formazione di connettivo (ORGANIZZAZIONE DELLA FIBRINA): la separazione può solo essere chirurgica.

In questo caso non si parla più di aderenze ma di SINECHIE

sull'endocardio:

- ENDOCARDITE VEGETATIVA reumatica o infettiva, (streptococcus viridans, ecc)

Le concrezioni dell'essudato provocano alterazione delle valvole cardiache (stenosi o insufficienza)

Pezzi di fibrina possono staccarsi dai coaguli di essudato: emboli (spesso contengono batteri causali dell'endocardite che sono quindi veicolati in altri organi con infezioni metastatiche)

sulle meningi:

- MENINGITE TUBERCOLARE

Conseguenze:

- su mucose, sierose o superfici esterne: formazione di **pseudomembrane** e poi **cotenne** (quando particolarmente spesse)

- su superfici opposte: formazione di **aderenze** e poi **sinechie**

L'ancoraggio di tali formazioni può essere superficiale o profondo

Evoluzione

- Distacco ed espulsione pseudomembrane (possibile ulcerazione)

- Dissoluzione ad opera di enzimi leucocitari (lisi e riassorbimento)

- Organizzazione (retrazione: grave sulle valvole cardiache)

- Calcificazione

Complicanze:

- Ostacolo alla motilità di organi (es cuore, polmoni, intestino)

- Ostacolo alla viabilità dell'aria, degli alimenti, ecc..(organi cavi)

- Occlusione alveoli (CARNIFICAZIONE POLMONARE per organizzazione della fibrina): polmone perde la cavità diventando un organo fibroso

FLOGOSI PURULENTA

Essudato più grave, caratterizzato da una altissima migrazione di globuli bianchi che conferiscono all'essudato stesso un colore giallognolo e un aspetto cremoso e denso.

La migrazione dei leucociti è dovuta alla presenza di patogeni che producono una grande quantità di molecole chemiotattiche.

(es. olio di croton: sostanza tossica che induce una forte migrazione dei globuli bianchi)

Si forma un essudato chiamato PUS cremoso, giallastro.

PUS: essudato cremoso, giallastro o verdastro (pseudomonas pyocyanea), più o meno denso, PH acido

Con la centrifugazione del PUS si ottengono 2 frazioni:

Parte liquida: contiene frammenti si proteine, peptidi, aminoacidi, acidi nucleici, acido lattico, acidi grassi, trigliceridi.

La frammentazione è dovuta a enzimi litici presenti nella parte liquida (proteasi, lipasi, ecc…possono corrodere un tessuto vivente). Questi enzimi litici derivano dalla parte solida (cellule).

Non c'è fibrinogeno

Parte solida: contiene moltissimi PMN (PIOCITI) a vari stadi di degenerazione, frammenti cellulari, detriti necrotici, microbi interi o a pezzi.

I piociti sono le cellule che liberano grandi quantità di enzimi litici e a causa di questa liberazione sono a loro volta danneggiati e frammentati.

La flogosi purulenta se non curata in tempo può uccidere una persona. Per curarla è sufficiente solitamente un antibiotico.

Caratteristiche:

- Imponenti fenomeni vascolo-essudativi

- Ricchissima migrazione di leucociti

- Importanti fenomeni degenerativo-necrotici

Localizzazioni ed aspetti della flogosi purulenta:

su superfici libere: pus scorre sulle superfici di organi cavi interni distruggendo la struttura

- blenorrea (malattia venerea causata da un gonococco): pus all'interno dell'uretra

- sinusiti, congiuntiviti, vaginiti

- otiti, mastoiditi

- cistiti

Se trova una via di uscita scola fuori: si osserva **leucorrea** (flusso bianco) o **scolo purulento**

sulla cute:

- piodermite (impetigine): pus infiltra il derma

- pustole: pus nelle vesciche (scollamento dermo-epidermico riempito di materiale purulento)

- foruncolo: pus all'interno di un follicolo pilifero (stafilococco)

- favo cutaneo: se sono interessati più follicoli piliferi vicini

- idrosadenite: flogosi purulenta che riguarda le ghiandole sudoripare

in cavità preesistenti: EMPIEMA (cavità interna piena di pus)

- piotorace: pus nel torace
- pioperitoneo: pus nel peritoneo
- piocele: pus nella tonaca vaginale testicolare
- pioartro: pus nell'articolazione
- pionefrosi: pus nel calice renale
- piosalpinge: pus nelle tube uterine
- piopericardio: pus nel pericardio

se infiltra i tessuti:

- **FLEMMONE**: flogosi purulenta invasiva che infiltra l'interstizio e diffonde lungo guaine tendinee, borse sierose, fasci muscolari (streptococchi)

Non è trattabile con antibiotici o chirurgicamente.

in cavità neoformate:

- **ASCESSO:** flogosi purulenta circoscritta. È una raccolta di pus in una cavità neoformata scavata dal pus stesso.

Struttura dell'ascesso: pus al centro circondato da un reticolo di fibrina e da tessuto in degenerazione infiltrati da PMN. All'esterno c'è una zona di edema con altri PMN in minor concentrazione

Causa dell'ascesso: di solito è lo stafilococcus aureus la cui coagulasi è responsabile della formazione del reticolo di fibrina (MEMBRANA PIOGENICA)

La flogosi purulenta non coagulerà mai a causa della presenza degli enzimi litici nella parte liquida: il pus rimarrà sempre liquido per quanto possa essere denso.

Patogenesi dell'ascesso:

- Flogosi sierosa o sierofibrinosa iniziale (o raramente purulenta già inizialmente)
- Migrazione massiva dei PMN
- L'addensamento dei PMN che degenerano, muoiono e si frammentano causa ipossia e/o azione di tossine microbiche
- Liberazione di enzimi proteolitici, lipolitici, ecc.. dai PMN morenti con rilascio di enzimi litici all'esterno: digestione del tessuto e formazione di una cavità in cui si raccoglie il pus (fluttuazione dell'ascesso per rammollimento del tessuto)
- Automantenimento del processo

L'ascesso cresce irregolarmente: si formano canali nelle zone più lasse del tessuto.

Si formeranno canali e cavità ascessuali intercalate che espandono la lesione a varie zone del tessuto dell'organo in cui si sviluppa il processo.

Questi canali scavati dal pus si chiamano FISTOLE: hanno un percorso spesso irregolare, tortuoso. Possono raggiungere la superficie dell'organo e bucarla permettendo l'uscita del pus che si riversa in un'altra cavità o in un altro organo.

L'evoluzione naturale dell'ascesso è quindi la formazione delle fistole che invadono vari organi danneggiandoli.

Le fistole, essendo dei canali, aprendosi tra un organo e un altro, possono anche mettere in comunicazione organi che non devono essere in comunicazione (fistole tra colon e tenue; fistola artero-venosa; fistola fra vescia e retto)

Quando la fistola si apre all'esterno può succedere che il pus trova una via di scolo e fuoriuscire all'esterno. La fuoriuscita interrompe il circolo vizioso PMN chiama PMN e di conseguenza l'ascesso può fermarsi.

Per trattare l'ascesso, la cosa migliore è l'incisione chirurgica dell'ascesso (prima che si formino le fistole): si incide l'ascesso, lo si svuota e si puliscono le pareti necrotiche intorno ad un ascesso e si mette dentro un drenaggio prima di richiudere. Dal drenaggio è possibile drenare altro pus che si riformerà e introdurre antibiotici.

Evoluzione dell' ascesso:

Fistolizzazione: canali tortuosi attraversanti "loci minoris resistentiae" con altre cavità ascessuali intercalate (possibile svuotamento dell'ascesso e guarigione)

Organizzazione della membrana piogenica: formazione di una capsula fibrosa con definitiva circoscrizione.

Espansione dell'ascesso: tramite erosione e spostamento all'esterno della membrana piogenica (possibile svuotamento dell'ascesso e cicatrizzazione), più facilmente attraverso la formazione di fistole.

Possibili complicanze:

PIEMIA: pus nel sangue

SUPPURAZIONE: trasformazione di un qualsiasi tipo di flogosi a flogosi purulenta

Svuotamento nelle sierose: formazione di EMPIEMI

Impianto di germi putrefattivi: ascessi gangrenosi

Talora è necessario il drenaggio chirurgico

Nota:

L'ascesso rappresenta una flogosi acuta di lunga durata: cronica come andamento nel tempo, acuta per il tipo di cellule coinvolte

EZIOLOGIA DELLA FLOGOSI PURULENTA: dovuto nella maggior parte dei casi da BATTERI PIOGENI

Microrganismi a forte virulenza (tossine, invasività, fattori antifagocitari) e liberazione di sostanze a forte azione chemiotattica e necrotizzante (batteriche, leucocitarie, umorali)

Batteri piogeni (COCCHI):

Stafilococchi (ascessi, pustole, foruncoli)

Streptococchi (flemmoni, ascessi meno densi)

Meningococchi (meningite)

Gonococchi (uretrite, metrite, vaginite, congiuntivite)

Pneumococchi (polmoniti)

Batteri (e non batteri) piogeni facoltativi:

Escherichia coli (appendicite, diverticolite)

Klebsiella (polmoniti, uretriti, mastoiditi)

Enterobacter (enteriti, colecistiti)

Citrobacter (cistiti, uretriti)

Proteus (infezioni vie urinarie, otiti)

Pseudomonas (infezioni urinare, otiti, congiuntiviti)

Bacteroides (polmoniti, otiti, enteriti, appendiciti, infezioni delle ferite chirurgiche)

Salmonella

Brucella (ascessi epatici)

Actinomiceti

Entamoeba (ascessi epatici)

Prima di avere l'antibiogramma e di aver isolato il microrganismo si da una terapia antibiotica contro i cocchi.

Sostanze ad azione chemiotattica e irritante

Trementina

Olio di croton

Mercuriali

Ammoniacali

Solo se la loro azione è intensa e continua

FLOGOSI NECROTIZZANTE ED EMORRAGICA

La necrosi deve essere causata dalla flogosi e non viceversa: prevalenza dei fenomeni regressivi e necrotici fin dall'inizio: deve essere violenta fin dall'inizio

NON c'è flogosi necrotizzante se la necrosi è precedente e responsabile della risposta infiammatoria (es. infarto)

Eziopatogenesi:

- Azione di tossine batteriche

- Azione di enzimi istolitici

- Turbe circolatorie (trombosi)

Esempi:

- Infezioni da Clostridi proteolitici e saccarolitici (ferite, fratture): anaerobi che attivano la fermentazione di zuccheri causando putrefazione con rilascio di gas dalle ferite

- Vaiolo: forme emorragiche per alterazione della coagulazione

- Tifo esantematico (endoteli): rickettsie hanno un tropismo per gli endoteli dei vasi danneggiandoli

- Colite ulcerosa: malattia autoimmunitaria caratterizzata da un'attivazione di linfociti e anticorpi che attaccano e distruggono il colon (colon ulcerato e sanguinolento).